

# Untersuchung zur mikrobiologischen Optimierung eines bioelektrochemischen Systems (BES) für die Anwendung in der Abwasseraufbereitung

Zur Erlangung des akademischen Grades einer  
DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

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

genehmigte

DISSERTATION

von

**Stefanie Epple**

aus

Orbis

Dekan: Prof. Dr. Reinhard Fischer

Referent: Prof. Dr. Johannes Gescher

Korreferent: Prof. Dr. Harald Horn

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Oktober 2017



Dieses Werk ist lizenziert unter einer Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz (CC BY 4.0): <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die es mir möglich gemacht haben, ein solches Projekt überhaupt anzugehen und mit dieser Arbeit auch zu beenden.

Als erstes möchte ich mich dabei bei Johannes bedanken! Vielen Dank, dass du mich damals so nett in der AG Gescher aufgenommen und es mir ermöglicht hast, mehr als nur meine Masterarbeit in der Arbeitsgruppe durchzuführen. Eigentlich wollte ich zu Beginn des Master-Studiums nichts mehr mit Mikrobiologie zu tun haben und bin auch nur rein zufällig in der Arbeitsgruppe für ein F2-Praktikum gelandet, aber deine Art und Weise für die Sache zu begeistern, hat mich dann doch noch einmal von den kleinen Organismen überzeugt und mein Interesse war geweckt! Dass ich einmal aus Abwasser Strom machen darf, hätte ich nie gedacht. Danke für dieses interessante Thema!

Nicht nur Johannes, sondern auch die komplette Arbeitsgruppe hat dazu beigetragen, dass ich dort nicht mehr weg wollte. Vor allem habe ich in Flo und Kadda direkt zu Beginn zwei tolle Freunde gefunden, mit denen ich einige Trash-TV-Abende bei Bier oder einem guten Weinchen und teilweise versalztem Essen hatte. Besonders in Kadda habe ich eine Kreativ-Seelenverwandte gefunden, mit der ich nicht nur beim Basteln auf einer Wellenlänge bin. Vielen Dank, dass ich euch beide kennengelernt habe!

Die nächsten Personen, die mir während dieser Zeit enorm wichtig geworden sind, ist die Besatzung aus Büro 1! Unser Büro hat sich zu einem richtig heimeligen, vertrauten Plätzchen gemausert, in das ich sehr gerne komme. Danke an die Mädels France, Tina und Thea, dass ihr für mich in der Zeit nicht nur Arbeitskolleginnen, sondern auch richtige Freundinnen geworden seid! Unser morgendlicher Kaffee-Klatsch wird mir sehr fehlen, bzw. tut er das jetzt schon, wo leider nicht mehr alle da sind. Ich hoffe trotz allem, dass wir auch über die klitze kleine Entfernungen (Basel – Karlsruhe – Orbis) die Freundschaft erhalten und unsere Kaffee-Kränzchen weiterführen können, wenn auch nur gelegentlich. Von wem soll ich denn sonst die neusten Neuigkeiten erfahren? Außerdem wurde unsere Mädels-Runde mit Mara und Lia jetzt auch etwas größer. Und Tobi möchte ich natürlich auch danken, der als Hahn im Korb des Öfteren durchaus viel mit uns ertragen musste, dies aber immer tapfer mit Kopfhörer überlebt hat. Danke dir auch, dass das Chaos mit deiner Ruhe immer in Schach gehalten hast und uns regelmäßig mit Schoki versorgt hast!

Danke auch an Sebastian. Du hast mir im Labor immer sehr geholfen, wenn ich mal nicht weiterwusste. Aber auch darüber hinaus haben wir uns immer super verstanden und haben mit Anni und Daniel und vielen anderen immer lustige Koch-Sessions veranstaltet. Auch einen herzlichen Dank an Anni, die uns zu diesen Treffen immer mit den tollsten Nachtischen überrascht hat.

Liebe Sibylle, auch dir vielen Dank, dass ich in deinem Team sein durfte und du mir in der letzten schwierigen Zeit immer mit Ratschlägen zur Seite gestanden hast.

Fredi, auch dir möchte ich danken, dass du mir im Labor immer geholfen hast und mich in die MFC-Technik eingewiesen hast. Als ehemalige Straßen-Nachbarn haben wir auch lustige Abende bei sehr leckerem Essen und Trash-TV verbracht!

Liebe Esther, ich bin echt froh, dich kennengelernt und etwas Pfälzer Unterstützung bei den Badensern bekommen zu haben. Es war mir immer eine Freude, „kurz“ zum Quatschen bei dir vorne vorbei gekommen zu sein!

Ich möchte auch dem kompletten Rest, der ganzen Arbeitsgruppe, für eure Unterstützung bedanken. Ihr seid echt toll und hoffe, das bleibt auch so. Auch ehemaligen Kollegen und den zahlreichen Hiwis, Praktikanten, Bachelor und Master-Studenten gilt ein herzlicher Dank, denn so einiges wäre ohne euch nicht zu bewerkstelligen gewesen!

Auch meinen Kooperationspartnern aus dem Projekt BioMethanol danke ich herzlich für die Unterstützung und die tolle Zusammenarbeit!

Liebe Lenya, als meine allerbeste Freundin möchte ich dir danken, dass du alle meine Abschlussarbeiten so tapfer Korrektur gelesen hast, obwohl du kein einziges Wort von dem, was dasteht, verstanden hast. Vielen Dank auch für deine Freundschaft. Wir kennen uns schon so lange und so eine Freundin wie dich findet man sehr schwer und auch bestimmt nicht nochmal! Ich freue mich sehr darauf, dass wir uns jetzt bald wieder häufiger sehen.

Zum Schluss möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die mir am meisten bedeuten! Liebe Mama, lieber Papa, vielen, vielen Dank, dass ihr mir diesen extrem langen Weg ermöglicht habt und mich in allem, was ich bisher gemacht habe, immer unterstützt habt. Ohne euch wäre ich nicht so weit gekommen und hätte es bis hier hin geschafft! Lieber Daniel, danke für dein grenzenloses Verständnis und deine Unterstützung in allem, indem ich deine Hilfe gebraucht habe. Du bist immer für mich da, egal, was ist und ob das für dich gerade viel Aufwand bedeutet. Ich bin froh, dich an meiner Seite zu haben!

Vielen Dank!

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle Ausführungen, die anderen Schriften wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, sind durch die Angabe der Quelle kenntlich gemacht. Diese Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Fassung noch nicht Bestandteil einer Prüfungsleistung. Beim Anfertigen dieser Arbeit habe ich alle Regeln zur Sicherung der guten wissenschaftlichen Praxis des KITs beachtet und die Primärdaten gemäß Absatz A (6) am Institut für Angewandte Biowissenschaften – Abteilung Angewandte Biologie archiviert. Weiterhin versichere ich, dass die elektronische Form mit der schriftlichen Form dieser Arbeit übereinstimmt.

Die Experimente zur vorliegenden Arbeit wurden von März 2014 bis Mai 2017 am Institut für Angewandte Biowissenschaften der Fakultät für Chemie- und Biowissenschaften am Karlsruher Institut für Technologie unter der Leitung von Professor Johannes Gescher durchgeführt.

---

Ort, Datum

---

Stefanie Epple

## **Beiträge zu Konferenzen**

Epple S., Gescher J. (2017). Treatment of industrial wastewater and energy generation via Microbial Fuel Cells (MFC). Vortrag, 5. gemeinsame Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) und der Vereinigung für allgemeine und angewandte Mikrobiologie (VAAM) 2017, 05. bis 08.03.2017

Epple S., Gescher J. (2017). Industrial wastewater treatment and energy generation in a Bio-electrochemical System (BES). Posterpräsentation, Trilaterales BES-Meeting, 06.02.2017

## Zusammenfassung

In den letzten Jahrzehnten ist die Nachfrage an Trinkwasser durch das stetige Wachstum der Weltbevölkerung, aber auch der Industrialisierung, immer weiter angestiegen. Zudem sind auch der Anstieg von Treibhausgasemissionen und die Limitierung der fossilen Brennstoffe zu globalen Herausforderungen der Zukunft geworden. Abfallströme, wie z.B. Abwasser, könnten als alternative Energiequelle dienen. Im Hinblick auf erneuerbare Energien, haben sog. bioelektrochemische Systeme in den letzten Jahren immer mehr Aufmerksamkeit erlangt. Über solche Systeme kann, mit Hilfe von sog. exoelektrogenen Mikroorganismen, chemische Energie direkt in elektrische Energie umgewandelt werden. Da in Abwasser eine enorme Menge an interner chemischer Energie in Form von organischen Substraten steckt, wäre die Anwendung eines BES-Systems in der Abwasseraufbereitung eine nachhaltige und umweltfreundliche Methode, bei der gleichzeitig Strom produziert werden würde. Ziel dieser Arbeit war es, die große Menge an Substrat, hauptsächlich Acetat, aus einem industriellen Abwasser über ein solches BES-System zu entfernen und dabei Strom zu generieren. In einem ersten Schritt wurden dafür potentielle exoelektrogene Mikroorganismen aus dem Abwasser isoliert und nachfolgend deren Fähigkeit zur Eliminierung der Kohlenstoffverbindungen und der Stromproduktion getestet. Hierfür wurden verschiedene Ansätze mit den Isolat und dem exoelektrogenen Laborstamm *G. sulfurreducens* in einem Batch-Experiment für 21 Tage und einem Durchfluss-Experiment für 92 Tage getestet. In dem Durchfluss-Experiment wurde zudem der Einfluss der Flussrate auf die Leistung des Systems untersucht. Die maximal produzierte Stromdichte mit  $1368,25 \text{ mA/m}^2$ , wurde in einem Durchfluss-Experiment mit den Isolat und *G. sulfurreducens* erreicht. In dem Batch-Experiment mit gleicher Zusammensetzung der Organismen wurden lediglich  $14,89 \text{ mA/m}^2$  Strom produziert. In einer Versuchsreihe mit den Isolat alleine zeigte das Durchfluss-System mit  $656,97 \text{ mA/m}^2$  wieder eine bessere Leistung als das Batch-System mit  $7,6 \text{ mA/m}^2$ . *G. sulfurreducens* alleine hingegen produziert  $27,78 \text{ mA/m}^2$  Strom in einem Batch-System. Auch der TOC-Verbrauch und die Coulomb'sche Effizienz (CE) ist in dem Durchfluss-Experiment mit den Isolat und *G. sulfurreducens* mit 72,9% (TOC) und 54,98% (CE) am größten. In dem entsprechenden Batch-Experiment wurden lediglich 30,9% TOC verbraucht und die CE beträgt 1,3%. Die Isolate zeigen im Durchfluss-Experiment einen TOC-Verbrauch von 29,93% und eine CE von 23,79% und im Batch-Experiment 15,49% (TOC) und 1,6% (CE). Der Laborstamm alleine zeigt im Batch-Experiment einen TOC-Verbrauch von 16,47% und eine CE von 4,48%. In allen Versuchen konnte immer wieder ein rapider Abfall des pH-Wertes festgestellt werden. Somit wurde eines der Durchfluss-Systeme mit einer automatischen pH-Kontrolle ausgestattet, welche die Leistung des Systems zunehmend steigern konnte. Um den Einfluss des Abwassers auf die Mikroorganismen, besonders auf *G. sulfurreducens*, zu testen, sollten in Wachstumsversuchen mögliche Störstoffe,

wie Phosphat und Ammonium, im Abwasser identifiziert werden und eine Adaptation an das Abwasser durch den Laborstamm herbeigeführt werden. In der ersten Versuchsreihe zeigte der Laborstamm jedoch keine Einschränkungen im Wachstum mit den Phosphat- und Ammoniumkonzentrationen, welche dem des Abwassers entsprachen. Bei der zweiten Versuchsreihe, dem Adaptationsversuch in 75% Abwasser, war die Adaptation nicht in einer gesteigerten Wachstumsrate sichtbar, sondern auf zellulärer Ebene durch erhöhte Expressionslevel an im Energiestoffwechsel (Citratzyklus und Acetat-Oxidation) beteiligter Enzyme und NADH-Dehydrogenasen. Zudem waren einige Transporter, welche Toxine und andere antimikrobielle Stoffe aus der Zelle transportieren ebenfalls verstärkt exprimiert. Eine Transkriptomanalyse brachte ebenfalls Aufschluss über die zellulären Mechanismen in den Zellen auf der Anode des Durchfluss-Experiments mit *G. sulfurreducens* und den Isolaten. Auch hier zeigte der Laborstamm eine verstärkte Anpassung an das Abwasser, wie zuvor beschrieben. Zudem konnte der Unterschied in der Expression der Gene aufgrund des gewählten Elektronenakzeptors aufgezeigt werden: Bei der Verwendung der Anode als Elektronenakzeptor wurden vermehrt Cytochrome und Pilus-Proteine produziert, um den extrazellulären Elektronentransport zu gewährleisten. Aber auch wichtige Proteine, welche für die Interaktion und die Ausbildung von Biofilmen notwendig sind, wurden hier vermehrt produziert. Über die Metatranskriptomanalyse konnten ebenfalls mögliche Stoffwechselwege, wie zum Beispiel die gemischte Säuregärung oder der Abbau von Cellulose aufgeklärt und damit eine mikrobielle Syntrophie der Isolate und dem Laborstamm *G. sulfurreducens* identifiziert werden. In einer letzten Versuchsreihe wurde eines der Isolate näher charakterisiert. *Clostridium* sp. I zeigte die höchste  $\text{Fe}^{3+}$ -Reduktion innerhalb von 24 h und es konnte zudem gezeigt werden, dass der Stamm möglicherweise  $\text{Fe}^{3+}$  als Elektronensenke nutzt, um eine höhere Energieausbeute zu erzielen. Jedoch war dieser in einer M3C mit definiertem Medium nicht in der Lage, Strom zu produzieren.

## Inhaltsverzeichnis

Danksagung .....	I
Eidesstattliche Erklärung .....	III
Beiträge zu Konferenzen .....	IV
Zusammenfassung .....	V
Inhaltsverzeichnis .....	VII
Abkürzungen und Formelzeichen.....	XI
Tabellenverzeichnis .....	XII
Abbildungsverzeichnis .....	XIV
1. Einleitung .....	1
1.1. Bioelektrochemische Systeme (BES) .....	3
1.2. Mikrobielle bioelektrochemische Systeme .....	4
1.3. Mikrobielle elektrochemische Technologie (MET) .....	5
1.3.1. Mikrobielle Brennstoffzelle (MFC) .....	6
1.3.2. Mikrobielle Elektrolysezellen (MEC) .....	8
1.3.3. Mikrobielle Elektrosynthese (MES).....	9
1.4. Extrazellulärer Elektronentransfer (EET) in MET .....	10
1.4.1. Direkter Elektronentransfer (DETM) .....	12
1.4.2. Elektronentransport über Nanowire .....	16
1.4.3. Vermittelter Elektronentransfer (METM) .....	17
1.5. Elektrochemisch aktive Mikroorganismen in mikrobiellen Brennstoffzellen.....	18
1.5.1. Organismen in Reinkulturen .....	18
1.5.2. Mischkulturen .....	19
1.6. Mikrobielle Brennstoffzellen in der Anwendung .....	20
1.6.1. Mikrobielle Brennstoffzelle im Sediment.....	20
1.6.2. Bioremediation .....	21
1.6.3. Abwasseraufbereitung .....	21
1.7. Zielsetzung.....	28
2. Material .....	29
2.1. Abwasser .....	29
2.1.1. Emschergenossenschaft.....	29
2.1.2. Solvay .....	29
2.2. Bakterienstämme .....	29
2.3. Chemikalien, Enzyme, Reagenzien und Kits .....	30
2.4. Primer .....	31
2.5. Sonden .....	32
2.6. M3C-Reaktor (3-Elektroden-Messprinzip) .....	32
3. Methoden .....	34

---

3.1. Isolierungskampagnen und Kulturmedien von potentiell exoelektrogenen Mikroorganismen aus den verschiedenen Abwässern .....	34
3.1.1. Isolierung aus dem Abwasser der Emschergenossenschaft.....	40
3.1.2. Isolierung aus dem Abwasser hinter dem Absetzzyklon (hA) und der Grobdosierung (GD) aus der Kläranlage der Firma Solvay.....	41
3.2. Wachstum der Isolate.....	41
3.2.1. Isolate der Emschergenossenschaft.....	41
3.2.2. <i>Clostridium</i> sp. I (So 1), <i>Clostridium</i> sp. II (So 2) und <i>Paenibacillus</i> sp. (So 4) (Isolate Solvay) .....	42
3.2.3. <i>E. coli</i> (So 3 – Isolat Solvay) .....	43
3.3. Wachstum des Laborstammes <i>Geobacter sulfurreducens</i> .....	44
3.4. Herstellung von Cryokulturen .....	45
3.5. Vorbereitung und Analyse des Abwassers (hinter Absetzzyklon) .....	45
3.6. Versuche zur Fe <sup>3+</sup> -Reduktion der Isolate.....	46
3.7. Wachstumsversuche mit <i>Clostridium</i> sp. I.....	46
3.8. Wachstumsversuche mit <i>Geobacter sulfurreducens</i> unter verschiedenen Bedingungen .....	47
3.8.1. Wachstum mit verschiedenen Abwasserkonzentrationen.....	48
3.8.2. Adaptationsversuch in 75% hA.....	49
3.8.3. Wachstum mit verschiedenen Phosphat- und Ammoniumkonzentrationen	50
3.9. M3C-Systeme mit hA-Abwasser.....	50
3.9.1. Vorbereitung der Kulturen .....	53
3.9.2. Batch-System.....	54
3.9.3. Durchfluss-System .....	56
3.9.4. Behandlung der Anode für weiterführende Analysen.....	60
3.10. M3C-System mit definiertem Medium .....	61
3.11. Molekularbiologische Methoden.....	62
3.11.1. PCR (Polymerase Chain Reaction).....	62
3.11.2. Agarose-Gelelektrophorese .....	64
3.11.3. Aufreinigung der PCR-Produkte (DNA).....	65
3.11.4. Bestimmung der Konzentration von genomischer DNA .....	65
3.11.5. DNA-Isolierung .....	66
3.11.6. RNA-Isolierung .....	67
3.11.7. DNaseI-Verdau.....	68
3.11.8. RNA-Amplifikation (aRNA).....	68
3.11.9. Umschreiben von aRNA in ds cDNA.....	69
3.11.10. qPCR (quantitative PCR) .....	69
3.11.11. FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) .....	72

---

3.12.	Analytische Methoden .....	80
3.12.1.	HPLC (High Performance Liquid Chromatographie) .....	80
3.12.2.	TOC (Total Organic Carbon) und TN (Total Nitrogen).....	81
3.12.3.	IC (Ionenchromatographie) .....	82
3.12.4.	Hach-Lange Küvetten-Tests .....	83
3.12.5.	Leitfähigkeitsmessung .....	83
3.12.6.	Ferrozine-Assay (colorimetrische Bestimmung von Fe <sup>2+</sup> ) .....	84
3.12.7.	Qubit® dsDNA High-Sensitivity Kit.....	84
3.13.	Sequenzierungsmethoden.....	85
3.13.1.	Sequenzierung nach Sanger .....	85
3.13.2.	Illumina-Sequenzierung für Metatranskriptomanalyse.....	85
3.13.3.	Illumina-Sequenzierung für Metataxonomanalyse .....	86
3.14.	Bioinformatische Auswertung .....	86
3.14.1.	BLAST .....	86
3.14.2.	Metatranskriptomdaten.....	86
3.14.3.	Metataxonomdaten.....	87
3.15.	Mikroskopie .....	87
3.15.1.	Bestimmung der Zellzahl .....	87
3.15.2.	Lichtmikroskopie.....	88
3.15.3.	Fluoreszenzmikroskopie .....	88
4.	Ergebnisse .....	90
4.1.	Isolierungskampagnen aus den verschiedenen Abwässern .....	90
4.2.	Analyse des hA-Abwassers der Firma Solvay .....	94
4.2.1.	Bestimmung der Phosphat-, Nitrat-, Nitrit- und Ammoniumkonzentration	95
4.2.2.	Bestimmung der Acetatkonzentration, des TOC und TN .....	95
4.2.3.	Bestimmung der Leitfähigkeit und des pH-Wertes.....	96
4.3.	Fe <sup>3+</sup> -Reduktion der Isolate .....	96
4.4.	Wachstumsversuche mit <i>Clostridium</i> sp. I.....	97
4.4.1.	Wachstumsversuche in Schottflaschen .....	98
4.4.2.	Wachstumsversuch in einer M3C.....	101
4.5.	Wachstumsversuche mit <i>G. sulfurreducens</i> in hA-Abwasser.....	102
4.5.1.	Wachstum mit verschiedenen Abwasserkonzentrationen.....	102
4.5.2.	Adaptation in 75% hA.....	104
4.5.3.	Wachstum bei erhöhter Phosphat- und Ammoniumkonzentration .....	107
4.6.	M3C mit hA-Abwasser im Batch.....	109
4.7.	M3C mit hA-Abwasser im Durchfluss .....	121
4.7.1.	Durchfluss-System in den ersten 92 Tagen.....	121
4.7.2.	Ansatz 2 mit pH-Kontrolle im Durchfluss-System für weitere 45 Tage ...	129

---

4.8.	Ermittlung der finalen Zusammensetzung der Organismen auf der Anode ...	134
4.9.	Transkriptomanalyse .....	136
5.	Diskussion.....	144
5.1.	Isolierungskampagnen aus den verschiedenen Abwässern .....	144
5.2.	Wachstumsversuche mit <i>Clostridium</i> sp. I .....	148
5.3.	M3C mit hA-Abwasser im Batch .....	150
5.4.	M3C mit hA-Abwasser im Durchfluss .....	156
5.5.	Ermittlung der finalen Zusammensetzung der Organismen auf der Anode ...	160
5.6.	Wachstumsversuche mit <i>G. sulfurreducens</i> .....	162
5.7.	Transkriptomanalyse .....	163
6.	Ausblick.....	171
6.1.	Charakterisierung der Isolate .....	171
6.2.	M3C zur Abwasseraufbereitung .....	171
7.	Referenzen .....	173
Anhang	.....	195

## Abkürzungen und Formelzeichen

Ag/AgCl	Silber/Silberchlorid-Referenzelektrode
AD	Adaptation Durchfluss
BES	bioelektrochemisches System
C	Clostridium
CE	Coulomb´sche Effizienz
CSB	chemischer Sauerstoffbedarf
DF	Durchfluss
e <sup>-</sup>	Elektronen
EE	erneuerbare Energien
Em	Isolat Emscher
FISH	Fluoreszenz In Situ Hybridisierung
GD	Grobdosierung
G.s.	<i>Geobacter sulfurreducens</i>
hA	hinter Absetzzyklon
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRT	hydraulische Verweilzeit
IC	Ionenchromatographie
M3C	mikrobielle Brennstoffzelle im 3-Elektroden-Messprinzip
MFC	mikrobielle Brennstoffzelle
NI	nicht inokuliert
OD	optische Dichte
RT	Raumtemperatur
So	Isolat Solvay
TC	gesamter Kohlenstoff
TIC	gesamter anorganischer Kohlenstoff
TN	gesamter gebundener Stickstoff
TOC	gesamter organischer Kohlenstoff
ÜN	über Nacht

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme. ....	29
Tabelle 2: Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Enzyme, Reagenzien und Kits. .....	30
Tabelle 3: Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer. ....	31
Tabelle 4: Alle in dieser Arbeit verwendeten Sonden. ....	32
Tabelle 5: Zusammensetzung des Fe <sup>3+</sup> -Citrat-Medium (Dolch <i>et al.</i> , 2015). ....	35
Tabelle 6: Zusammensetzung der 10 x Salze. ....	36
Tabelle 7: Zusammensetzung der Spurenelemente. ....	36
Tabelle 8: Zusammensetzung der Selenit-Wolframat-Lösung. ....	36
Tabelle 9: Zusammensetzung der Vitamin-Lösung. ....	37
Tabelle 10: Zusammensetzung des Fe <sup>3+</sup> -Citrat-Agars. ....	39
Tabelle 11: Zusammensetzung des Fe <sup>3+</sup> -Citrat-Grundmediums. ....	39
Tabelle 12: Zusammensetzung des Fe <sup>3+</sup> -Citrat-Mediums mit Glukose. ....	42
Tabelle 13: Zusammensetzung des LB-Mediums (engl. lysogeny broth). ....	44
Tabelle 14: Zusammensetzung des <i>Geobacter</i> -Mediums. ....	44
Tabelle 15: Zusammensetzung der Medien mit verschiedenen hA-Konzentrationen .....	48
Tabelle 16: Zusammensetzung des Kathodenmediums. ....	51
Tabelle 17: Zusammensetzung des Waschmediums. ....	54
Tabelle 18: Zusammensetzung des Anodenmediums-AD (Adaptation Durchfluss). ....	57
Tabelle 19: Zusammensetzung des Anodenmediums-C ( <i>Clostridium</i> ). ....	61
Tabelle 20: Zusammensetzung des 1 x TAE-Puffers. ....	65
Tabelle 21: Zusammensetzung des 10 x PBS-Puffers. ....	73
Tabelle 22: Zusammensetzung der Fixierlösung bei Flüssigkulturen. ....	74
Tabelle 23: Zusammensetzung der Fixierlösung bei Anoden. ....	74
Tabelle 24: Zusammensetzung der Working Solution. ....	76
Tabelle 25: In der Arbeit verwendete Sonden mit den gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen. .....	76
Tabelle 26: Zusammensetzung des Hybridisierungspuffers. ....	77
Tabelle 27: Zusammensetzung der Lösung für die feuchte Kammer. ....	78
Tabelle 28: Zusammensetzung des Waschpuffers. ....	78
Tabelle 29: Zusammensetzung von 20 x SSC. ....	79
Tabelle 30: Zusammensetzung des Einbettpuffers. ....	80
Tabelle 31: Die in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und die dementsprechenden Filter des Mikroskops. ....	89
Tabelle 32: Isolierte Mikroorganismen aus dem Abwasser der Emschergenossenschaft (Em). ....	90
Tabelle 33: Isolierte Mikroorganismen aus dem Abwasser der Firma Solvay (So). ....	91
Tabelle 34: Gemessene Konzentrationen [mM] von Ammonium, Nitrat und Nitrit im hA- Abwasser. ....	95
Tabelle 35: Gemessene Acetatkonzentration [mM], TOC [g/L] und TN [g/L] von April 2014 bis März 2016 unter Angabe des Mittelwertes der einzelnen Parameter. ....	95
Tabelle 36: Wachstumsrate $\mu$ und Verdopplungszeit $t_d$ von <i>Clostridium</i> sp. I unter Respirations- und Gärungsbedingungen. ....	99
Tabelle 37: Acetat- und Butyratausbeute pro mol Glukose im Gärungs-, Respirationsversuch und in der M3C. ....	102
Tabelle 38: Wachstumsrate $\mu$ und Verdopplungszeit $t_d$ von <i>G. sulfurreducens</i> bei verschiedenen hA-Konzentrationen. ....	104
Tabelle 39: Wachstumsrate $\mu$ und Verdopplungszeit $t_d$ der 5 Adaptationsgenerationen (AG) von <i>G. sulfurreducens</i> bei 75% hA. Ergebnisse der Triplikate. ....	105

---

Tabelle 40: Wachstumsrate $\mu$ und Verdopplungszeit $t_d$ des stärksten Ansatzes jeder der 5 Adaptationsgenerationen (AG) von <i>G. sulfurreducens</i> bei 75% hA. ....	107
Tabelle 41: Wachstumsrate $\mu$ und Verdopplungszeit $t_d$ von <i>G. sulfurreducens</i> mit den potentiellen Störstoffen Phosphat ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) und Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ).....	108
Tabelle 42: FoldChange der exprimierten Gene des Citratzyklus und der Acetat-Oxidation. ....	140
Tabelle 43: Identifizierte Proteine der Isolate aus dem Durchfluss-Experiment. ....	142
Tabelle 44: Daten der Metatranskriptomanalyse .....	195
Tabelle 45: Daten der Metatranskriptomanalyse .....	218

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema einer chemischen Brennstoffzelle.....	3
Abbildung 2: Schema einer mikrobiellen Brennstoffzelle (MFC).....	7
Abbildung 3: Schema einer mikrobiellen Elektrolysezelle (MEC).....	8
Abbildung 4: Schema einer mikrobiellen Elektrosynthesezelle (MES).....	9
Abbildung 5: Schemata der verschiedenen Mechanismen zum extrazellulären Elektronentransfer am Beispiel einer Anode.....	11
Abbildung 6: Vereinfachtes Schema des extrazellulären Elektronentransfers.....	13
Abbildung 7: Vereinfachtes Schema einer kommunalen Kläranlage.....	25
Abbildung 8: M3C-Reaktor mit einem Volumen von 280 ml.....	33
Abbildung 9: Verschaltungsschema der mikrobiellen Brennstoffzelle im 3-Elektroden- Messprinzip.....	52
Abbildung 10: M3C-Reaktor (280 ml) im Batch-System.....	56
Abbildung 11: M3C-Reaktor (280 ml) im Durchfluss-System.....	58
Abbildung 12: M3C-Reaktor (280 ml) im Durchfluss-System mit pH-Kontrolle.....	59
Abbildung 13: Schnittmuster der Anode.....	60
Abbildung 14: Amplifizierungsplot der qPCR.....	70
Abbildung 15: Vereinfachtes Schema der Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green I an die DNA.....	71
Abbildung 16: Isolate aus dem Abwasser der Emscher-Genossenschaft.....	93
Abbildung 17: Isolate aus dem Abwasser von hinter dem Absetzzyklon und der Grobdosierung der Firma Solvay.....	94
Abbildung 18: Fe <sup>3+</sup> -Reduktion der Isolate.....	97
Abbildung 19: Wachstum und Fe <sup>3+</sup> -Reduktion von <i>Clostridium</i> sp. I.....	99
Abbildung 20: OD <sub>600</sub> , Edukt- und Produktspektrum von <i>Clostridium</i> sp. I im Wachstumsversuch.....	100
Abbildung 21: Produzierte Stromdichte, OD <sub>600</sub> und Edukt- und Produktspektrum von <i>Clostridium</i> sp. I in der M3C.....	101
Abbildung 22: Wachstumsverhalten von <i>G. sulfurreducens</i> bei verschiedenen hA- Konzentrationen.....	103
Abbildung 23: Wachstumsverhalten der 5 Adaptationsgenerationen (AG) von <i>G.</i> <i>sulfurreducens</i> in 75% hA.....	105
Abbildung 24: Wachstumsverhalten der Adaptationsgenerationen (AG) von <i>G.</i> <i>sulfurreducens</i> bei 75% hA.....	106
Abbildung 25: Wachstumsverhalten von <i>G. sulfurreducens</i> mit den potentiellen Störstoffen .....	108
Abbildung 26: Gemessene Stromdichte der Ansätze 1 und 2 und der Negativkontrolle in der M3C mit hA-Abwasser im Batch-System über 21 Tage.....	110
Abbildung 27: Acetatkonzentration [mM] und TOC [g/L] der Ansätze 1 und 2 in der M3C mit hA-Abwasser im Batch-System über 21 Tage.....	112
Abbildung 28: pH-Wert der Ansätze 1 und 2 in der M3C mit hA-Abwasser im Batch- System über 21 Tage und Daten der Negativkontrolle mit dem NI hA-Abwasser.....	113
Abbildung 29: Gemessene Stromdichte des Ansatzes 3 in der M3C mit hA-Abwasser im Batch-System über 21 Tage.....	115
Abbildung 30: <i>G. sulfurreducens</i> im Batch-System der M3C mit hA-Abwasser (Ansatz 3). .....	115
Abbildung 31: pH-Wert, TOC und Acetatkonzentration des 3. Ansatzes mit <i>G.</i> <i>sulfurreducens</i> in der M3C mit hA-Abwasser im Batch-System über 7 bzw. 21 Tage.....	117
Abbildung 32: Mittlerer TOC-Verbrauch und mittlere Stromdichte der 3 Ansätze im Batch- System der M3C.....	118

---

Abbildung 33: FISH-Färbung der Anode der Ansätze 1 bis 3 im Batch-System der M3C. ....	120
Abbildung 34: Gemessene Stromdichte der Ansätze 1 und 2 in der M3C mit hA-Abwasser im Durchfluss-System über 92 Tage. ....	122
Abbildung 35: Gemessene Stromdichte und der pH-Wert der Ansätze 1 und 2 in der M3C mit hA-Abwasser im Durchfluss-System über 92 Tage. ....	124
Abbildung 36: TOC und Acetatkonzentration der Ansätze 1 und 2 in der M3C mit hA-Abwasser im Durchfluss-System über 84 Tage. ....	127
Abbildung 37: Mittlere Stromdichte der Ansätze 1 und 2 im Batch-Systems und Durchfluss-System der M3C. ....	128
Abbildung 38: Gemessene Stromdichte des 2. Ansatzes in der M3C mit hA-Abwasser im Durchfluss-System über 45 Tage nach dem Austausch des Kathodenkompartiments. ...	130
Abbildung 39: TOC und Acetatkonzentration des 2. Ansatzes nach dem Tausch des Kathodenkompartiments in der M3C mit hA-Abwasser im Durchfluss-System über weitere 45 Tage. ....	131
Abbildung 40: FISH-Färbung der Anode und der planktonischen Phase des Ansatzes 2 im Durchfluss-System der M3C. ....	133
Abbildung 41: Mittlere Stromdichte und Zellzahl von <i>G. sulfurreducens</i> des 2. Ansatzes im Batch-System und Durchfluss-System der M3C. ....	135
Abbildung 42: Verteilung der Mikroorganismen auf den Anoden des 2. Ansatzes im Batch-System und Durchfluss-System der M3C. ....	135
Abbildung 43: Expressionslevel relevanter Gene von <i>G. sulfurreducens</i> aus der 6. AG im Vergleich zu der 1. AG der in 75% hA gewachsenen Zellen. ....	137
Abbildung 44: Expressionslevel relevanter Gene von <i>G. sulfurreducens</i> aus dem Durchfluss-Experiment im Vergleich zu der 6. AG und der 1. AG. ....	138
Abbildung 45: Citratzyklus und Acetat-Oxidation von <i>G. sulfurreducens</i> . ....	140
Abbildung 46: Mögliche syntrophe Beziehung der Isolate und <i>G. sulfurreducens</i> in der M3C mit hA-Abwasser. ....	168

## 1. Einleitung

Angekommen im Jahr 2017 sind die Themen „CO<sub>2</sub>-Emission“, „Klimawandel“ und „erneuerbare Energien“, wie seit einigen Jahren schon, immer noch stark präsent, wenn nicht sogar präsenter denn je. Eine der wichtigsten globalen Herausforderungen derzeit ist es, die Treibhausgasemissionen zu vermindern. Mit dem Beginn der Industrialisierung wurden Gase in die Atmosphäre eingebracht, die die ursprünglichen Verhältnisse, im Vergleich zur vorindustriellen Zeit, stark änderten. Es wurde weltweit ein Anstieg von Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) um ca. 43%, von Methan (CH<sub>4</sub>) um 150% und von Distickstoffoxid (N<sub>2</sub>O) um 20% verzeichnet. Zudem gelangen neue Stoffe in die Atmosphäre, die größten Teils anthropogenen Ursprungs sind, wie zum Beispiel Fluorchlorkohlenwasserstoffe (FCKW) (Umweltbundesamt, 2014). Aber nicht nur dieses fortwährende wirtschaftliche Wachstum, sondern auch die stetig steigende Nachfrage von Energie für die menschlichen Bedürfnisse trägt zu diesen hohen Emissionen bei. Die Zahl der Weltbevölkerung wird in den nächsten Jahren weiter ansteigen, so Roser und Ortiz-Ospina (2017). Zwar nicht so stark, wie in den vergangenen Jahrzehnten, aber bis 2100 soll die Weltbevölkerung auf 11,2 Milliarden Menschen anwachsen (Roser & Ortiz-Ospina, 2017). Um die soziale und wirtschaftliche Entwicklung aufrechtzuerhalten, bedarf es einem garantierten und bezahlbaren Zugang zu Energie. Diese Energienachfrage wird derzeit weltweit zu ca. 80% über fossile Brennstoffe, wie Öl, Kohle und Gas gedeckt (IEA, 2013; Moomaw *et al.*, 2011). Um diesen Treibhausgasausstoß zu vermindern, muss der Primärenergieverbrauch zusätzlich über andere umweltfreundlichere Energiequellen gedeckt werden, wie zum Beispiel erneuerbare Energien (EE). Derzeit werden lediglich ca. 14% des weltweiten Primärenergieverbrauchs darüber gedeckt (IEA, 2016a). Und der Primärenergiebedarf wird in den nächsten Jahren weiter steigen. Die International Energy Agency schätzt einen weltweiten Anstieg um 40% bis 2035, wobei fossile Brennstoffe dabei immer noch 75% des Bedarfs decken sollen. Zudem sind die fossilen Brennstoffe keine unendliche Ressource, das heißt sie werden irgendwann aufgebraucht sein. Wann genau, ist unklar, da es noch unentdeckte Quellen von fossilen Brennstoffen gibt. Jedoch ist auch unklar, welches Ausmaß diese Quellen aufweisen (IEA, 2013). Der enorme Ausstoß von Treibhausgasen, speziell CO<sub>2</sub>, hat ebenfalls einen Anstieg der Temperatur der Erd- und Meeresoberfläche zufolge. Im globalen Schnitt betrug diese 0,85°C in einem Zeitraum von 1880 bis 2012 (IPCC, 2014). Im Pariser Abkommen von 2015 wurde beschlossen, dass der Anstieg der globalen Durchschnittstemperatur in diesem Jahrhundert (bis 2100) auf unter 2% über dem vorindustriellem Niveau begrenzt werden soll (IEA, 2016b). Für das Erreichen solcher Ziele müssen unerschöpfliche Energieressourcen, die bereits erwähnten erneuerbaren Energien, in Zukunft eine größere Rolle bei der Abdeckung des Primärenergiebedarfs spielen. Zudem haben viele Teile der Weltbevölkerung keinen uneingeschränkten Zugang zu Energie. Auch hierfür könnten die

erneuerbaren Energien eine Lösung darstellen. Zu den erneuerbaren Energien zählen Biomasse (fest oder gasförmig), Windkraft, Wasserkraft, Wärmepumpe, Fotovoltaik, Geothermie, Solarthermie, Abfälle und Biokraftstoffe (Bundesministerium für Wirtschaft und Energie, 2017). Der größte Teil, der hier den primären globalen Energiebedarf im Jahr 2008 deckt, ist die Energieerzeugung über Biomasse (pflanzliches oder tierisches biologisches Material). Auch Entwicklungsländer oder abgelegene ärmliche Regionen der Erde könnten prinzipiell von dieser Art der Energie profitieren und dort zu einer sozialen und ökonomischen Entwicklung führen (Edenhofer *et al.*, 2011). In Deutschland beispielsweise stieg die Bruttostromerzeugung aus erneuerbaren Energien in der Zeit von 1990 bis 2016 stetig an (18,9 Mrd. kWh auf 188,3 Mrd. kWh). Der Anteil der EE am Bruttostromverbrauch ist damit von 3,4% (Jahr 1990) auf 31,7% (Jahr 2016) gestiegen. Trotz dieser Steigerung ist kaum ein Anstieg von 2015 auf 2016 zu verzeichnen. Dies liegt darin begründet, dass im Jahr 2016 die Stromerzeugung witterungsbedingt niedriger war als im Vorjahr (Umweltbundesamt, 2017). Demnach kann man trotz allem einen Nachteil an einigen EE, wie zum Beispiel der Windkraft oder Fotovoltaik erkennen: Diese Technologien sind abhängig von unserem Klima (Edenhofer *et al.*, 2011). Eine weitere interessante und bisher kaum genutzte Ressource, sind beispielsweise Abfallströme. Zu diesen zählen Abwasser und CO<sub>2</sub>. Wie bereits beschrieben, kommt es global zu einem Ausstoß von hohen Mengen CO<sub>2</sub> und mit dem sozialen und industriellen Wachstum, der Urbanisierung und dem Anstieg der Weltbevölkerung steigt auch die Nachfrage und der Bedarf an Frischwasser und damit auch die Menge an produziertem Abwasser. Der globale Bedarf an Frischwasser wird schätzungsweise um 55% bis 2050 ansteigen und zudem haben viele Länder keinen uneingeschränkten Zugang zu Frischwasser (Koncagül *et al.*, 2017; UN-WWAP, 2015). Schätzungsweise haben eine Milliarde Menschen in Entwicklungsländern keinen Zugang zu sauberem, nicht gesundheitsschädlichem Trinkwasser. Zudem haben auch mehr als zwei Milliarden Menschen nicht einmal mehr Wasser für die eigene Hygiene (Bartram, 2008). Der enorme Bedarf an Frischwasser für die Industrie aber auch für die Landwirtschaft führt zur Auszehrung des Grundwassers und auch des Oberflächenwassers, wie beispielsweise Seen oder Flüsse (Chapagain & Orr, 2009, Ridoutt & Pfister, 2010). Das dadurch entstehende Abwasser könnte als eine optimale Ressource für Frischwasser genutzt werden. Eine Möglichkeit, solche Abfallströme zu nutzen, stellen sog. bioelektrochemische Systeme (BES) dar (Liu *et al.*, 2004; Nevin *et al.*, 2010). In den folgenden Kapiteln werden die genannten bioelektrochemischen Systeme näher erläutert. Es wird aufgezeigt, welche Möglichkeiten mit einem solchen Funktionsprinzip im Bereich der erneuerbaren Energien bestehen.

## 1.1. Bioelektrochemische Systeme (BES)

Das zugrundeliegende Prinzip bioelektrochemischer Systeme ist die klassische chemische Brennstoffzelle. Mit dieser wird die chemische Energie eines Brennstoffes direkt in elektrische Energie umgewandelt. Ein Beispiel dafür ist die Wasserstoff-Sauerstoff ( $H_2/O_2$ )-Brennstoffzelle. Diese besteht hauptsächlich aus zwei Elektroden, der Anode und Kathode, welche über einen Elektrolyten (Ionenleiter) oder eine Membran voneinander getrennt sind. Diese/r Elektrolyt/Membran trennt Gase voneinander, ist aber für bestimmte Ionen durchlässig. Der Anode wird kontinuierlich der Brennstoff, in diesem Fall Wasserstoff, zugeführt und der Kathode Sauerstoff in Form von Luft. An der negativ geladenen Anode wird nun  $H_2$  oxidiert, während an der positiv geladenen Kathode  $O_2$  reduziert wird. Die bei der Oxidation entstandenen Elektronen fließen, bedingt durch die Potentialdifferenz, über einen externen Stromkreis von der Anode zu der Kathode. Währenddessen fließen die Ionen, in diesem Fall Protonen, durch den Elektrolyten von der Anodenseite zur Kathodenseite. Auf der Kathodenseite entsteht durch die Reduktion von Sauerstoff  $H_2O$  (siehe Abb. 1). Abhängig vom Elektrolyt und der Temperatur werden verschiedenen Ionen transportiert. Somit gibt es unterschiedliche Typen von Brennstoffzellen (de Bruijn, 2005).

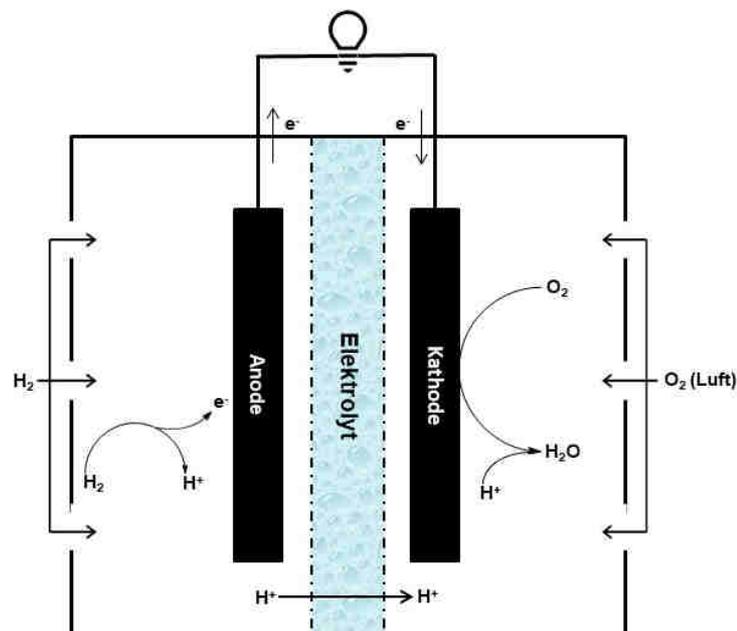


Abbildung 1: Schema einer chemischen Brennstoffzelle.

Neben diesen chemischen Brennstoffzellen spielen seit einigen Jahren immer mehr die sog. bioelektrochemischen Systeme (BES) eine wichtige Rolle. In der Bioelektrochemie werden elektrochemische Vorgänge in biologischen Systemen

untersucht, wozu auch die oben genannten BES gehören. Systeme dieser Art nutzen biologische Komponenten, wie Enzyme, Proteine, DNA oder lebende Zellen (Mikroorganismen), um Strom aus den verschiedensten Substraten zu gewinnen. Enzymatische BES beispielsweise haben jedoch einige Nachteile gegenüber den mikrobiellen BES: diese Systeme haben aufgrund der kurzen Halbwertszeit der Enzyme eine kurze Lebensdauer. Auch die Substratspezifität der Enzyme schränkt die Leistung sehr ein. Mikrobielle BES hingegen bieten den Vorteil, dass in diesen Systemen Mikroorganismen eingesetzt werden, die sich selbstständig reproduzieren und damit steigt auch deren Lebensdauer. Ebenfalls können komplexere Substrate effizienter oxidiert werden und die optimalen Betriebsbedingungen (Umgebungstemperatur und nahezu neutraler pH-Wert) machen die mikrobiellen BES für verschiedenste Anwendungen vielseitig einsetzbar (Lapinsonnière *et al.*, 2012; Schröder, 2007). Im folgenden Kapitel werden die mikrobiellen BES in Bezug auf ihren Aufbau, die unterschiedlichen Arten und Funktionsbereiche näher erläutert.

## 1.2. Mikrobielle bioelektrochemische Systeme

1911 wurde von M. C. Potter zum ersten Mal über ein bioelektrochemisches System berichtet. In seinen Versuchen verwendete er *E. coli*- und *Saccharomyces cerevisiae*-Kulturen, in die er eine Platinelektrode einbrachte. Beide Kulturen zeigten eine Erhöhung des Potentials unter optimierten Versuchsbedingungen in einer Art Galvanischen Zelle (Potter, 1911). Seit dieser Zeit ist das Feld der mikrobiellen BES stark angewachsen und es muss zwischen einigen Systemen unterschieden werden. Für mikrobielle BES wird in der Literatur der Terminus mikrobielle elektrochemische Technologie (MET) verwendet. Die hier zugrundeliegende Interaktion der Mikroorganismen mit der Elektrode kann auf der einen Seite kapazitiver und auf der anderen Faraday'scher Natur sein. Die kapazitive Interaktion beschreibt dabei lediglich die Umladung der elektrochemischen Doppelschicht, die sich vor der Elektrode, ausbildet. An der Elektrode gibt es einen Bereich, indem der Elektrolyt auf die Elektrode trifft. An dieser Grenzschicht bildet sich eine elektrochemische Doppelschicht aus, welche aus Ionen und Wassermolekülen des Elektrolyten, abhängig von den Ladungen, zusammengesetzt ist. Verschieben sich nun die Ladungen innerhalb dieser Doppelschicht durch die Anlagerung oder Ablösung der Organismen von der Elektrode, fließt ein Strom. Dieser wird als kapazitiver Strom bezeichnet. Von Faraday'schem Strom spricht man, wenn durch die Phasengrenze der Doppelschicht Ladungen treten. In dem Fall von mikrobiellen Faraday-Prozessen geht es um Oxidations- und Reduktionsprozesse, die zwischen den Mikroorganismen und der Elektrode stattfinden (siehe 1.3. extrazellulärer Elektronentransfer (EET) in MET) (Schröder *et al.*, 2015). Hier kann man zwei verschiedene Interaktionen unterscheiden: den pseudo-kapazitiven Prozess und

die mikrobielle Elektrokatalyse. Im ersten Fall geht es um prokaryotische Zellen oder Biofilme, die aufgrund von *c*-Typ-Cytochromen eine superkapazitive Wirkung aufweisen. Hierbei funktionieren diese als elektro-aktive Spezies und können durch temporäre Speicherung von Elektronen über multi-häm *c*-Typ-Cytochrome im Periplasma und der äußeren Membran schnelle Redoxreaktionen an Oberflächen auslösen (Malvankar *et al.*, 2012; Methé *et al.*, 2003). Die mikrobielle Elektrokatalyse beschreibt elektrochemische Reaktionen von Mikroorganismen, die zum extrazellulären Elektronentransfer befähigt sind. Durch die Übertragung der Elektronen von den Mikroorganismen auf die Elektrode werden die Redoxprozesse beschleunigt, indem die Überspannung des Systems gesenkt und kinetische Barrieren für Redoxprozesse an Elektroden überwunden werden. Dies führt zur Steigerung des Stromflusses. Mikroorganismen gehen hierbei nicht unverändert hervor und sind daher im klassischen Sinne keine Katalysatoren. Sie sind aktiv an einer Reaktion beteiligt und beziehen daraus Reduktionäquivalente für den eigenen Metabolismus (Schröder, 2007).

### **1.3. Mikrobielle elektrochemische Technologie (MET)**

In der mikrobiellen elektrochemischen Technologie unterscheidet man zwischen den primären METs und den sekundären METs. Die primären METs umfassen Technologien, die auf den zuvor beschriebenen Faraday-Prozessen beruhen. Hier spielt vor allem die mikrobielle Elektrokatalyse basierend auf dem extrazellulären Elektronentransport die übergeordnete Rolle. Die Mikroorganismen, die zu dieser Art von Elektronentransport befähigt sind, nennt man elektrochemisch aktive Mikroorganismen oder auch exoelektrogene Mikroorganismen. Für die extrazelluläre Übertragung von Elektronen gibt es verschiedene Mechanismen. Auf diese Mechanismen wird in 1.4. (extrazellulärer Elektronentransfer (EET) in MET) näher eingegangen. In solchen Systemen liegt das bevorzugte angelegte Elektrodenpotential im physiologischen Bereich der verwendeten Mikroorganismen (Schröder *et al.*, 2015). Spannungen, die im stark Negativen oder Positiven angelegt werden, nutzt man hingegen für sekundäre METs. Diese Art von MET zeigen eine eher indirektere Verbindung zwischen der Elektrochemie und der Mikrobiologie, im Sinne von Anpassung und Kontrolle der biologisch kompatiblen Bedingungen im System, wie pH-Wert, Sauerstoffpartialdruck, Temperatur oder Metabolitkonzentration. Die Mikroorganismen sind hier nicht im direkten Kontakt mit der Elektrode, bzw. übertragen ihre Elektronen auf diese, sondern es findet beispielsweise eine elektrochemische Reaktion an der Elektrode statt, bei der abiotisch Stoffe umgesetzt werden. Die daraus entstehenden Produkte können dann von Mikroorganismen weiter verstoffwechselt werden, wodurch die Bedingungen im System aufrecht erhalten werden (Gimkiewicz *et al.*,

2017). Aus dem Prinzip der primären METs heraus haben sich eine Reihe von Technologien entwickelt, wie zum Beispiel die mikrobielle Brennstoffzelle (MFC), die mikrobielle Elektrolysezelle (MEC), die mikrobielle Meerwasserentsalzung (MDC), photomikrobielle Brennstoffzellen (photoMFC), das Biocomputing und die mikrobielle Elektrosynthese (MES) (Agler-Rosenbaum *et al.*, 2013; Schröder *et al.*, 2015). Im Folgenden wird jedoch nur auf drei dieser Systeme näher eingegangen.

### 1.3.1. Mikrobielle Brennstoffzelle (MFC)

Mikrobielle Brennstoffzellen (MFC; engl.: **m**icrobial **f**uel **c**ell), sind unter allen METs die am längsten und besten erforschte Technologie (Allen & Bennetto 1993). In einer MFC werden Bakterien genutzt, um die chemische Energie aus Substraten in elektrische Energie umzuwandeln. Die Bakterien katalysieren die Oxidation der Substrate über bestimmte Elektronentransporter, welche elektrochemisch aktiv sind. Dabei befinden sich die Organismen in dem Anodenkompartiment, welches über eine Protonenaustauschmembran von dem Kathodenkompartiment getrennt ist. Bei der Oxidation werden Elektronen und CO<sub>2</sub> frei, wobei die Elektronen auf die Anode übertragen werden und über einen externen Stromkreis zur Kathode fließen. Die aus der Oxidation entstandenen Protonen wandern über die Protonenaustauschmembran in das Kathodenkompartiment und werden dort zusammen mit den Elektronen auf einen Elektronenakzeptor, wie zum Beispiel Sauerstoff übertragen. Die Redoxreaktionen an Anode und Kathode und der Elektronenfluss führen zur Stromproduktion. Der eben beschriebene Aufbau und die Funktionsweise entspricht der einer klassischen MFC. Um die Oxidation der Substrate zu gewährleisten, muss das Anodenkompartiment unter anoxischen Bedingungen und frei von anderen alternativen Elektronenakzeptoren gehalten werden, da der extrazelluläre Elektronentransport auf die Anode eine Art der anaeroben Respiration (Torres *et al.*, 2009) von exoelektrogenen Mikroorganismen darstellt. Das Kathodenkompartiment hingegen wird unter oxischen Bedingungen gehalten (siehe Abb. 2) (Lovley, 2006).

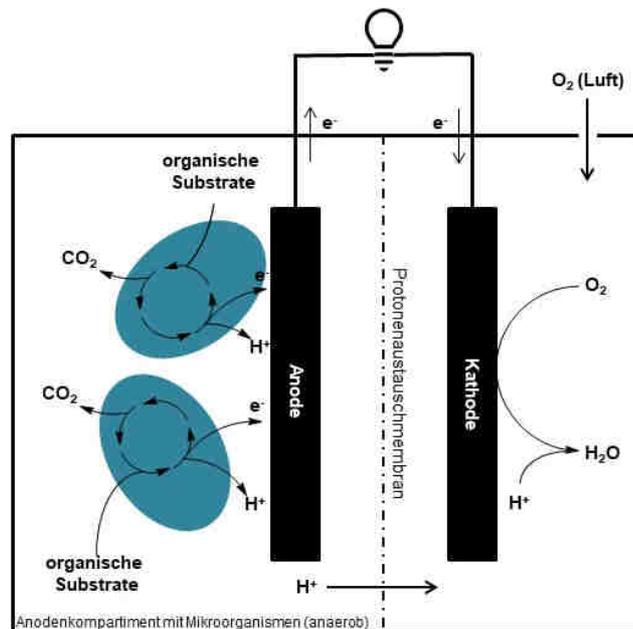


Abbildung 2: Schema einer mikrobiellen Brennstoffzelle (MFC).

Für die Anodenreaktion der Mikroorganismen und damit die Effizienz dieses Systems ist das Anodenpotential ein sehr wichtiger Faktor. Dieses sollte im physiologischen Bereich der verwendeten Mikroorganismen liegen, um den Elektronentransfer auf die Anode zu gewährleisten (Aelterman *et al.*, 2008). Dabei darf es allerdings auch nicht zu sehr im positiven Bereich liegen (Schröder *et al.*, 2015). Bei Versuchen mit *Shewanella oneidensis* MR-1 konnte nachgewiesen werden, dass die Zellaktivität mit einer Zunahme (ab +600 mV vs. SHE) des Potentials sinkt (TerAvest & Angenent, 2014). Zudem konnte gezeigt werden, dass ein optimales mittleres Anodenpotential für viele Organismen bei 0 mV vs. SHE (standard hydrogen electrode) (entspricht -200 mV vs. Ag/AgCl) liegt (Aelterman *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2002). Aus diesem Grund wird in vielen Anwendungen der sog. 3-Elektroden-Aufbau verwendet (M3C) (Nevin *et al.*, 2008; Torres *et al.*, 2009). Über einen Potentiostaten und eine Referenzelektrode (zum Beispiel Silber/Silberchlorid-Referenzelektrode, Ag/AgCl) wird ein Potential an der Arbeitselektrode (Anode) angelegt, welches für eine effiziente Leistung des Systems garantieren soll. Durch das Anlegen des optimalen mittleren Anodenpotentials der Organismen von 0 mV vs. SHE, wird zudem das optimale Kathodenpotential aufrecht erhalten (Rosenbaum *et al.*, 2011). Mit dem Anlegen eines bestimmten Potentials wird verhindert, dass sich das Anodenpotential aufgrund der Ladung der am Elektronentransport beteiligten Redox-Komponenten verändert (Logan, 2009). Für die Materialbeschaffenheit der Anoden gibt es einige wichtige Anforderungen: Zum einen sollte das Material eine gute elektrische Leitfähigkeit und einen geringen Widerstand aufweisen, biologisch verträglich, chemisch stabil, nicht korrosiv und widerstandsfähig sein und eine große Oberfläche zum Austausch der Elektronen und Besiedelungsfläche für die

Organismen aufweisen. (Zhou *et al.*, 2011). Als Anodenmaterialien eignen sich beispielsweise rostfreier Stahl, Karbon (mit verschiedenen Oberflächenbeschaffenheiten) oder aber Graphit. Wobei Graphit-Vlies Anoden eine sehr große Oberfläche aufgrund der einzelnen Fasern besitzen. Als Kathodenmaterial wird bevorzugt Platin verwendet (Logan *et al.*, 2006). Die verschiedenen Anwendungsgebiete für mikrobielle Brennstoffzellen werden in Kapitel 1.5 genauer beschrieben.

### 1.3.2. Mikrobielle Elektrolysezellen (MEC)

Die Verwendung von mikrobiellen Elektrolysezellen (MEC; engl.: **m**icrobial **e**lectrolysis **c**ell) ist eine relativ neue Technologie und eine abgewandelte Form der MFC. Hier werden im Anodenkompartiment ebenfalls exoelektrogene Mikroorganismen eingesetzt, die organische Substrate oxidieren und die Elektronen auf die Anode übertragen (anaerober Prozess). Im Kathodenkompartiment herrschen jedoch auch anoxische Bedingungen, so kann hier kein Sauerstoff reduziert und damit auch kein Strom produziert werden. Durch das Anlegen einer externen Spannung von  $> 0,2$  V kann an der Kathode durch Reduktion der Protonen, die bei der Oxidation an der Anodenseite entstanden sind,  $H_2$  produziert werden (siehe Abb. 3). Im Vergleich zu der MFC wird hier durch das Anlegen einer Spannung die Reaktion erzwungen, um Elektrolyseprodukte, wie zum Beispiel  $H_2$  zu produzieren (Call & Logan, 2008). Ein anderes Produkt einer solchen Reduktionreaktion an der Kathode kann beispielsweise Methan sein (Cheng *et al.*, 2009).

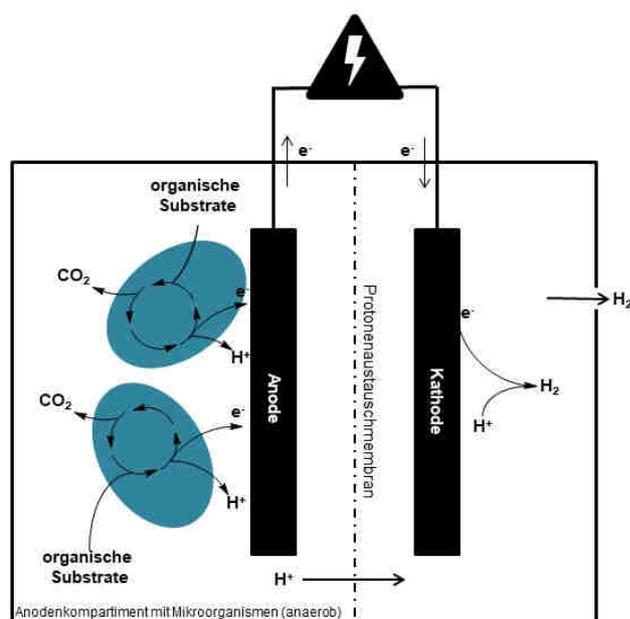


Abbildung 3: Schema einer mikrobiellen Elektrolysezelle (MEC).

### 1.3.3. Mikrobielle Elektrosynthese (MES)

Alle bisher beschriebenen Systeme bezogen sich auf die Interaktion der Mikroorganismen mit den Anoden. Eine weitere, ebenfalls neue, Technologie zeigt, dass Mikroorganismen in bioelektrochemischen Systemen auch zu Kathodeninteraktionen befähigt sind. Es wurden Bakterien identifiziert, die Elektronen direkt von der Elektrode (hier die Kathode) beziehen können, um komplexere Biomoleküle aufzubauen, indem sie  $\text{CO}_2$  reduzieren. Diese Reaktion läuft jedoch nur ab, wenn dem System Strom zugeführt wird. Somit handelt es sich hierbei um eine Umkehrreaktion der MFC-Technologie. Im Anodenkompartiment werden hierbei über Hydrolyse Elektronen auf die Anode übertragen und wandern zur Kathode. Das Kathodenkompartiment ist auch hier anoxisch. An der Kathode können die Elektronen dann von den Bakterien aufgenommen und  $\text{CO}_2$  zu komplexeren Kohlenstoffverbindungen reduziert werden (siehe Abb. 4) (Marshall *et al.*, 2012; Bajracharya *et al.*, 2016). Für diese Art der Elektrodeninteraktion sind sog. acetogene Mikroorganismen, wie zum Beispiel *Sporomusa ovata* verantwortlich (Nevin *et al.*, 2010). Allerdings bietet die MES Anwendungen im Bereich der EE in Bezug auf die Nutzung des Abfallstromes  $\text{CO}_2$  und der Speicherung von Energie in Form von komplexen Biomolekülen, wie beispielsweise Acetat (Nevin *et al.*, 2010). Wie bereits erwähnt kommt es global zu einem Ausstoß von hohen Mengen  $\text{CO}_2$ . Dies könnte den MES zugeführt und reduziert werden, um Kohlenstoffverbindungen herzustellen. Der Strom, der dem System zugeführt werden muss, könnte dabei aus bestehenden EE-Anlagen, wie Wind-, Solar- oder Wasseranlagen bezogen werden, da derzeit die Speicherung der dadurch entstandenen Energie in großem Maßstab während der Überproduktionszeiten nicht möglich ist (Agler-Rosenbaum *et al.*, 2013).

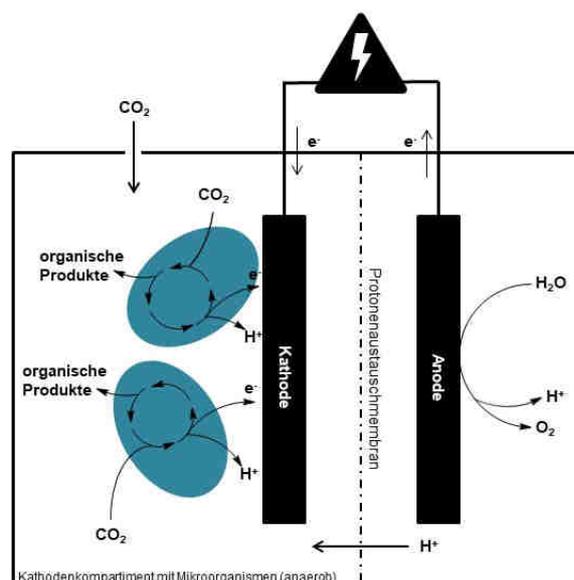


Abbildung 4: Schema einer mikrobiellen Elektrosynthesezelle (MES).

## 1.4. Extrazellulärer Elektronentransfer (EET) in MET

Wie bereits beschrieben, erfordert die Interaktion zwischen den Mikroorganismen und der Elektrode, dass Elektronen zwischen der Elektrode und den intrazellulären Elektronentransportketten ausgetauscht werden können. Die sog. exoelektrogenen Mikroorganismen sind zum extrazellulären Elektronentransfer befähigt, welcher eine Form der anaeroben Atmung ist. Zellatmung im Allgemeinen beschreibt Stoffwechselfvorgänge, die der Energiegewinnung einer Zelle dienen. Diese Energie erlangen sie durch die Oxidation von organischen Substraten, genauer gesagt, durch die dadurch freiwerdende Energie ( $\Delta G_{ox}$ ; wobei G=Gibbs-Energie und ox= Oxidationsprozess) (Schröder, 2007). Über eine Kaskade von Redoxreaktionen werden die bei der Oxidation freiwerdenden Elektronen schließlich auf einen Elektronenakzeptor übertragen. Je positiver das Redoxpotential des Elektronenakzeptors, im Vergleich zu dem des Elektronendonors, desto größer ist die Energieausbeute für den Organismus. Abhängig vom Elektronenakzeptor, können aerobe und anaerobe Atmung voneinander unterschieden werden. Bei der aeroben Atmung ist  $O_2$  der terminale Elektronenakzeptor. Über zellinterne Redoxreaktionen werden die Elektronen am Ende auf  $O_2$  übertragen, wobei  $H_2O$  entsteht. Über die Ausbildung eines Protonengradienten wird ATP synthetisiert. Aufgrund des stark positiven Redoxpotentials von  $O_2$  (Standardpotential von  $\frac{1}{2} O_2 / H_2O$ :  $E_0' = + 0,82 V$ ), ist die aerobe Atmung der Weg mit der größten Energieausbeute. Unter anoxischen Bedingungen können andere Verbindungen als Elektronenakzeptor genutzt werden. Darunter können sowohl lösliche, als auch unlösliche extrazelluläre Verbindungen sein, welche nicht membrangängig sind. Daher müssen die Elektronen über die Membran nach außen transportiert werden. Potentielle lösliche Elektronenakzeptoren, welche membrangängig sind, können unter anderem Nitrat ( $NO_3^-$ ) oder Nitrit ( $NO_2^-$ ) sein. Bei den unlöslichen, nicht membrangängigen Elektronenakzeptoren handelt es sich bspw. um Metalle wie Eisen ( $Fe^{3+}$ ) oder Mangan ( $Mn^{4+}$ ). Sind Mikroorganismen in der Lage, ihre Elektronen auf solche unlöslichen Akzeptoren zu übertragen, werden diese als exoelektrogen bezeichnet (TerAvest & Ajo-Franklin, 2016). Da deren Redoxpotential elektronegativer ist, als das von  $O_2$ , entsteht bei der anaeroben Atmung weniger Energie in Form von ATP, als bei der aeroben Atmung. Die Reduktion von  $Fe^{3+}$  ist hierbei die energetisch günstigste Form der anaeroben Atmung mit EET (Madigan *et al.*, 2008). Ebenso können Anoden in METs als unlösliche extrazelluläre Elektronenakzeptoren genutzt werden, wobei man hier von einer Anoden-Atmung spricht (siehe 1.3.1. Mikrobielle Brennstoffzelle (MFC)). Auch hier werden die Elektronen von dem Redoxpartner mit dem negativeren Redoxpotential auf den Redoxpartner mit dem positiveren Redoxpotential übertragen. Damit ist das Potential der Anode elektronegativer, als das der Kathode (Rabaey & Verstraete, 2005). Bei dem Elektronentransfer auf extrazelluläre Substanzen, bzw. Anoden, wird zwischen drei verschiedenen

Mechanismen unterschieden: dem direkten Elektronentransfer (DETM, engl.: direct electron transfer mechanism), dem vermittelten Elektronentransfer (METM, engl.: mediated electron transfer mechanism) und dem Elektronentransfer über sog. Nanowires (siehe Abb. 5). Um einen solchen direkten Elektronentransfer zu gewährleisten, müssen die Mikroorganismen Elektron-Transportproteine besitzen, die in der Membran eingelagert sind, sodass der Transport vom Inneren der Zelle nach außen erfolgen kann. Hierbei spielen *c*-Typ-Cytochrome eine wichtige Rolle. *c*-Typ-Cytochrome sind redoxaktive Proteine, welche mindestens eine prosthetische Häm-Gruppe besitzen und darüber Oxidations- oder Reduktionsreaktionen eingehen können (Schröder, 2007). Im Folgenden wird genauer auf die zugrundeliegenden Mechanismen eingegangen.

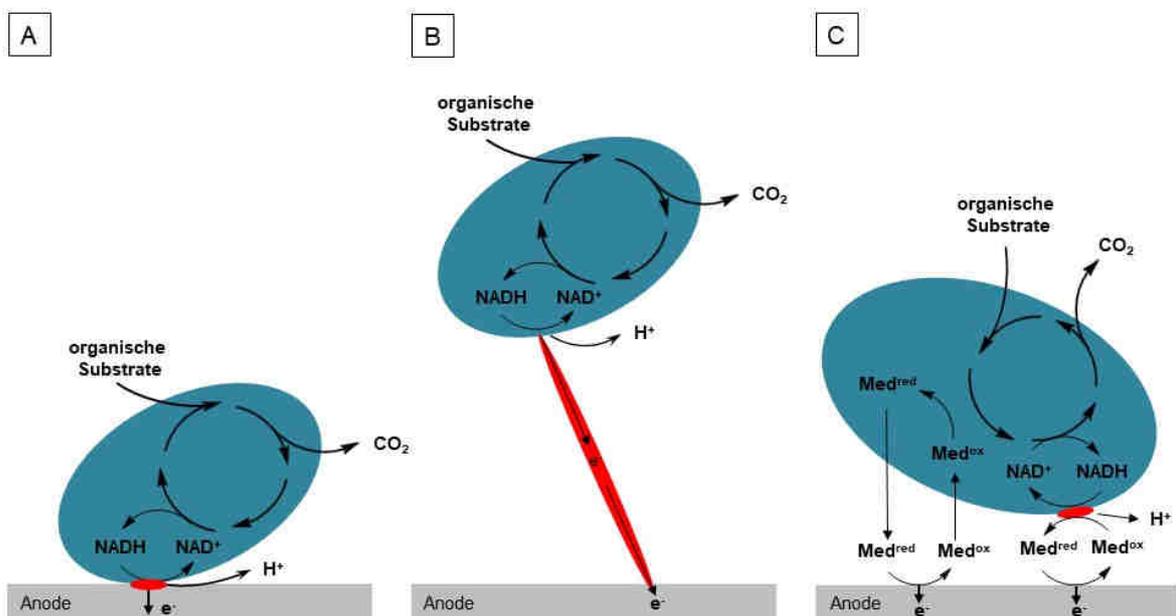


Abbildung 5: Schemata der verschiedenen Mechanismen zum extrazellulären Elektronentransfer am Beispiel einer Anode. A) Direkter Elektronentransfer (DETM) von Cytochromen an der äußeren Membran auf die Elektrode. B) Elektronentransfer von der Zelle auf die Elektrode über Nanowires zur Überwindung einer Distanz. C) Vermittelter Elektronentransfer (METM) zwischen der Zelle und der Elektrode über endogene oder exogene Redoxmediatoren zur Überwindung einer Distanz. (Schema verändert nach Schröder, 2007)

### 1.4.1. Direkter Elektronentransfer (DETM)

Der direkte Elektronentransfer (DETM, engl.: **d**irect **e**lectron **t**ransfer **m**echanism) findet über physischen Kontakt der Bakterienzelle mit der Anode statt, wobei keine diffundierenden Redoxspezies beteiligt sind, die die Elektronen von der Zelle auf die Elektrode übertragen. Wie bereits erwähnt, spielen *c*-Typ-Cytochrome eine wichtige Rolle bei dem extrazellulären Elektronentransfer (Schröder, 2007). Eine Vielzahl von Arten sind bekannt für ihre Fähigkeit zur Eisenreduktion ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (Lonergan *et al.*, 1996). Dabei sind die beiden bekanntesten und auch am besten untersuchten Mikroorganismen hinsichtlich des extrazellulären Elektronentransfers, *Shewanella oneidensis* MR-1 und *Geobacter sulfurreducens* (Kumar *et al.*, 2016). Im Folgenden wird der EET anhand dieser beiden Organismen näher erläutert. Abbildung 6 zeigt die molekularen Vorgänge schematisch dargestellt. *Shewanella oneidensis* MR-1 gehört zu den  $\gamma$ -Proteobakterien und ist Gram-negativ. Er kommt in vielen aquatischen und terrestrischen Lebensräumen vor und ist, aufgrund seiner zahlreichen potentiellen Elektronenakzeptoren ( $\text{O}_2$ ,  $\text{NO}_3^-$ , DMSO,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{4+}$ , etc.), die der Organismus für seinen Metabolismus nutzen kann, wissenschaftlich sehr interessant geworden (Beliaev *et al.*, 2005; Fredrickson *et al.*, 2008). Außerdem besitzt der Organismus die genetische Information zu einer Reihe von *c*-Typ-Cytochromen, von denen einige am Elektronentransport beteiligt sind (Heidelberg *et al.*, 2002). In Abbildung 6 A ist der Elektronentransfer vereinfacht dargestellt. Im ersten Schritt dieser erweiterten Elektronentransportkette werden die Elektronen von einer Oxidoreduktase (NADH:Quinon Oxidoreduktase) in den Menaquinon-Pool der Cytoplasmamembran übertragen. CymA (**c**ytoplasmic **m**embraneprotein **A**), ein tetra-Häm *c*-Typ-Cytochrom, gehört zu der NapC/NirT-Familie und ist eine Quinol-Dehydrogenase, welche eine kurze N-terminale Region besitzt, die in der Cytoplasmamembran verankert ist. Die Häm-Gruppen ragen dabei in das Cytoplasma hinein (Schwalb *et al.*, 2002; Schwalb *et al.*, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass bei der Deletion des Gens, welches für CymA codiert, der Organismus nicht mehr in der Lage ist,  $\text{Fe}^{3+}$  an der Zelloberfläche zu reduzieren (Myers & Myers, 1997). CymA oxidiert nun Quinol und überträgt die Elektronen weiter auf im Periplasma befindliche *c*-Typ-Cytochrome (Marritt *et al.*, 2012). Welche Cytochrome genau bei dem Elektronentransport von CymA zu Proteinen der äußeren Membran beteiligt sind, ist noch unklar. Mit einer Breite von 235 Å kann ausgeschlossen werden, dass die Elektronen direkt von CymA auf äußere Membranproteine übertragen werden (Dohnalkova *et al.*, 2011; Sturm *et al.*, 2015). Allerdings konnte zwei weiteren periplasmatischen *c*-Typ-Cytochromen - STC und FccA - eine Beteiligung am Elektronentransport nachgewiesen werden, vielmehr eine Interaktion mit CymA und MtrA (Fonseca *et al.*, 2012). STC (**s**mall **t**etrahaem **c**ytochrome **c**, tetra-Häm) und FccA (**F**lavocytocrome **c**, tetra-Häm) sind die am häufigsten vorkommenden *c*-Typ-Cytochrome während dem anaeroben Wachstum von *S. oneidensis* MR-1 (Tsapin *et al.*, 2001), jedoch zeigen

Mutanten beider Gene keine Veränderung im Wachstum mit Elektronenakzeptoren, wie beispielsweise  $\text{Fe}^{3+}$  oder Nitrat, im Vergleich zum Wildtyp. Allerdings können sie als wichtige Elektronentransfer-Zentren des Cytoplasmas angesehen werden, da mindestens eines der beiden Proteine, entweder STC oder FccA, notwendig sind für die Oxidation von CymA (Sturm *et al.*, 2015). Die Elektronen werden von diesen Cytochromen aus auf MtrA (**metal reducing protein A**) übertragen. MtrA ist ein Protein mit 10 Häm-Gruppen, welches löslich im Periplasma vorkommt. MtrA spielt eine wichtige Rolle in der Reduktion von Eisen und Mangan, da eine Mutante des Gens lediglich die Reduktion der beiden Metalle vermindert, nicht aber die Reduktion von Fumarat, Nitrat oder Nitrit (Beliaev *et al.*, 2001). MtrA bildet mit MtrB (**metal reducing protein B**) und MtrC (**metal reducing protein C**) einen Komplex (MtrABC-Komplex), welcher die Elektronen an die Zelloberfläche transportiert. MtrB ist ein  $\beta$ -Barrel Protein, welches die äußere Membran durchspannt (Hartshorne *et al.*, 2009) und MtrA und MtrC miteinander verbindet, welche jedoch nicht in der Membran lokalisiert sind. Neben MtrC ist auch OmcA auf der Zelloberfläche lokalisiert. Beides sind deca-Häm c-Typ-Cytochrome und bilden an der Zelloberfläche einen Komplex (Shi *et al.*, 2006). Beide Cytochrome können als terminale Reduktase bei der Reduktion von Metallen, wie  $\text{Mn}^{4+}$  oder  $\text{Fe}^{3+}$  dienen (Ross *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 2009).

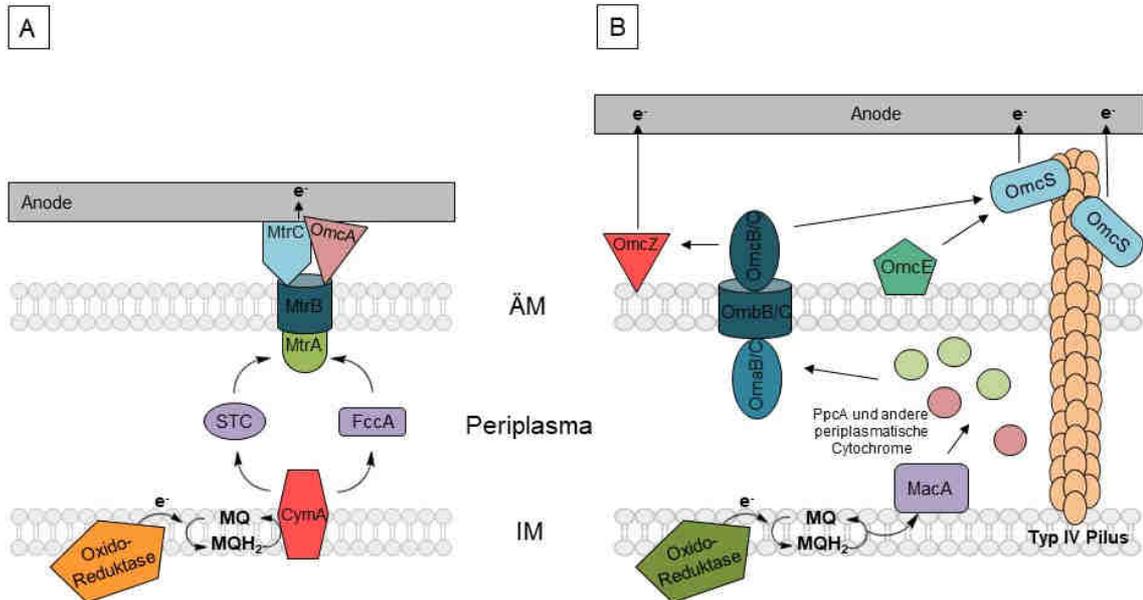


Abbildung 6: Vereinfachtes Schema des extrazellulären Elektronentransfers. A) Transfer der Elektronen in *S. oneidensis*, nach Pirbadian *et al.*, (2014). B) Hypothetischer Transfer der Elektronen in *G. sulfurreducens*, nach Santos *et al.* (2015).

*Geobacter sulfurreducens* gehört zu der Familie der Geobacteriaceae und damit zu den  $\delta$ -Proteobacteria. Der Gram-negative Organismus ist in vielen Oberflächensedimenten zu finden (Méthé *et al.*, 2003). Der extrazelluläre

Elektronentransport in *G. sulfurreducens* ist jedoch nicht ebenso gut aufgeklärt, wie für *Shewanella oneidensis* MR-1. Allerdings wurde mit 111 eine enorme Anzahl an möglichen *c*-Typ-Cytochromen bei der Sequenzierung des Genoms gefunden (Methé *et al.*, 2003). Auch *G. sulfurreducens*-Zellen sind in der Lage einen direkten Kontakt mit dem Elektronenakzeptor einzugehen. Als Elektronenakzeptoren finden sich hier auch Metalle, wie  $Mn^{4+}$  oder  $Fe^{3+}$  oder aber auch Fumarat. Bei dem Elektronentransfer des Organismus spielen jedoch nicht nur redoxaktive *c*-Typ-Cytochrome eine wichtige Rolle, sondern auch Typ IV Pili (Reguera *et al.*, 2005) (siehe Abb. 6 B). Bei dem Elektronentransfer werden auch hier im ersten Schritt die Elektronen aus den im Cytoplasma stattfindenden Stoffwechselwegen, wie Glykolyse und Citratzyklus, über Redoxäquivalente, wie bspw. NADH, auf eine Oxidoreduktase, welche in der Cytoplasmamembran lokalisiert ist, übertragen (Kumar *et al.*, 2016; Lovley, 2006). Von dort aus werden die Elektronen über den Menaquinon (MQ)/Menaquinol (MQH<sub>2</sub>)-Pool, welcher in der Cytoplasmamembran lokalisiert ist, transportiert. Neue Ergebnisse zeigen, dass die multihäm Cytochrome ImcH und CbcL, welche ebenfalls in der inneren Membran lokalisiert sind, an dem Transport der Elektronen aus dem Quinon-Pool beteiligt sind. Je nach Redoxpotential der extrazellulären Elektronenakzeptoren ändert sich der Elektronentransfer-Weg entweder über das Cytochrom ImcH oder CbcL. Dies lässt annehmen, dass der Organismus in der Lage ist, je nach äußeren Bedingungen, den Transferweg der Elektronen zu ändern und so eine höhere Energieausbeute pro übertragenem Elektron erlangt (Levar *et al.*, 2017; Zacharoff *et al.*, 2016). Im Anschluss werden die Elektronen weiter zu dem Cytochrom MacA (**metal reduction associated cytochrome A**) transportiert (Santos *et al.*, 2015). MacA ist ein dihämes *c*-Typ-Cytochrom, welches bei der Atmung mit  $Fe^{3+}$  als Elektronenakzeptor hoch exprimiert wird. Es ist in der inneren Membran lokalisiert (Kim & Lovley, 2008) und bei einer Deletion des Gens konnte gezeigt werden, dass die  $Fe^{3+}$ -Reduktion vermindert war. Es zeigten sich vor allem Einschränkungen in der Reduktion von  $Fe^{3+}$ -Oxiden im Vergleich zu  $Fe^{3+}$ -Citrat (Kim & Lovley, 2008; Ding *et al.*, 2008). Bei Fumarat als Elektronakzeptor konnte kein Unterschied im Wachstum der Mutante zum Wildtyp festgestellt werden (Butler *et al.*, 2004). Daher wird MacA eine große Rolle im extrazellulären Elektronentransfer zugesprochen. Ein weiteres *c*-Typ-Cytochrom im Periplasma, welches die Elektronen von der inneren zur äußeren Membran transportiert ist das PpcA (**periplasmic c-type cytochrome A**). Zwischen MacA und PpcA konnte eine Interaktion nachgewiesen werden. Daher wird davon ausgegangen, dass MacA seine Elektronen auf PpcA übertragen kann (Seidel *et al.*, 2012). PpcA besitzt 3 Häm-Gruppen und Mutationen in diesem Gen zeigten ebenfalls eine inhibierende Wirkung auf die  $Fe^{3+}$ -Reduktion, sowohl von  $Fe^{3+}$ -Oxiden, als auch von  $Fe^{3+}$ -Citrat (Lloyd *et al.*, 2003; Ding *et al.*, 2008). Für die Reduktion von extrazellulären Elektronenakzeptoren, muss der Transfer über die äußere Membran gewährleistet werden. Von den periplasmatischen Cytochromen werden die Elektronen auf einen Porin-Cytochrom-Protein-Komplex übertragen. Dieser Komplex besteht aus

dem periplasmatischen c-Typ-Cytochrom OmaB/OmaC, einem Porin-ähnlichen Protein OmbB/OmbC, welches in der äußeren Membran lokalisiert ist und den Cytochromen OmcB und OmcC, welche auf der Außenseite der Membran lokalisiert sind und ebenfalls einen Komplex mit den zuvor genannten Proteinen und Cytochromen bilden. Dieser Komplex ist für die Übertragung von Elektronen auf  $\text{Fe}^{3+}$ -Citrat oder Ferrihydrit verantwortlich (Liu *et al.*, 2014). OmcB (**outer membrane cytochrome B**), welches 12 Häm-Gruppen aufweist, ist sowohl für die Reduktion von  $\text{Fe}^{3+}$ -Oxiden, als auch von  $\text{Fe}^{3+}$ -Citrat verantwortlich. Eine Mutation des Gens hat die gleichen Auswirkungen zur Folge, wie eine Mutation des *macA*-Gens, Einschränkungen in der Reduktion von  $\text{Fe}^{3+}$ -Oxiden (Leang *et al.*, 2003; Qian *et al.*, 2007; Aklujkar *et al.*, 2013). OmcE (**outer membrane cytochrome E**) und OmcS (**outer membrane cytochrome S**), welche auf der Außenseite der Membran lokalisiert sind, sind für den Transfer der Elektronen auf unlösliche Elektronenakzeptoren, wie  $\text{Fe}^{3+}$ -Oxide oder auch Elektroden, zuständig. Die Deletion dieser Gene zeigt eine inhibierte  $\text{Fe}^{3+}$ -Reduktion für  $\text{Fe}^{3+}$ -Oxide, nicht aber für lösliches Eisen (Mehta *et al.*, 2005). Beide Gene werden auch beim Elektronentransfer auf Elektroden exprimiert und besitzen 6 Häm-Gruppen (Holmes *et al.*, 2006). OmcS spielt eine wichtige Rolle bei der Übertragung der Elektronen über Nanowires (Typ IV Pili) (siehe 1.4.2. Elektronentransport über Nanowire). Auch das c-Typ-Cytochrom OmcZ (**outer membrane cytochrome Z**) mit 8 Häm-Gruppen ist an der Außenseite der äußeren Membran lokalisiert. Es konnte gezeigt werden, dass das Protein eine höhere Transkriptionsrate aufweist, wenn der Elektronenakzeptor eine Elektrode anstatt Fumarat darstellt. Es wird angenommen, dass das Protein eine wichtige Komponente im Zusammenhang mit dem Elektronentransport in *G. sulfurreducens* ist, sobald die Zellen einen dicken Biofilm ausbilden. Dadurch kommt es zu einer hohen Stromproduktion. Eine Deletion des Gens führt zu einer reduzierten Stromproduktion, wohingegen es keinen Einfluss auf die Reduktion von  $\text{Fe}^{3+}$ -Oxid hat. Dies führt zu der Annahme, dass OmcZ lediglich wichtig beim Elektronentransfer von dicken Biofilmen ist, wo lange Strecken überwunden werden müssen. Ist jedoch ein dünner Biofilm ausgebildet und die Zellen sind in einer direkten Verbindung mit dem Elektronenakzeptor, kann auf das Cytochrom verzichtet werden, da der Transfer über andere Cytochrome gewährleistet wird (Nevin *et al.*, 2009). Der Elektronentransfer über mehrere Schichten eines Biofilms ist eine wichtige Voraussetzung beim Überwinden von Distanzen. Neben OmcZ ist hier ein weiteres Protein wichtig, das PilA für die Ausbildung eines TypVI Pili. Diese Art von Transfer wird näher in 1.4.2. (Elektronentransport über Nanowire) erläutert.

### 1.4.2. Elektronentransport über Nanowire

Für die Überwindung größerer Distanzen zum Elektronenakzeptor können zum einen Mediatoren (siehe 1.4.3.) verwendet werden oder sog. Nanowire. Nanowire sind leitfähige Fortsätze, die von einigen Mikroorganismen ausgebildet werden, die nicht in direktem Kontakt zu dem Elektronenakzeptor stehen oder aber sie werden für den Elektronentransfer von Zelle zu Zelle verwendet. *G. sulfurreducens* bildet sog. TypVI Pili aus, welche aus PilA-Monomeren aufgebaut sind. Der Pilus ist einmal im Periplasma an der Periplasmamembran verankert und zusätzlich in der äußeren Membran (Reguera *et al.*, 2005; 2006) (siehe Abb. 6 B). Es gibt zwei unterschiedliche Isoformen von PilA, einmal die langen PilA-Proteine und die kurzen PilA-Proteine. Experimente zeigten, dass Stämme, die lediglich die kurze Version der Proteine ausbildeten, sich weniger an die Oberfläche einer Grafit-Elektrode anlagern konnten, was den Einfluss und die Bedeutung des langen Monomers klarmacht. Das kurze PilA ist jedoch sehr wichtig für die Leitfähigkeit innerhalb des Biofilms, da es die Verteilung von OmcZ auf der äußeren Membran steuert (Richter *et al.*, 2012). Die Pili von *Geobacter sulfurreducens* können sowohl mit löslichen als auch mit unlöslichen Elektronenakzeptoren von dem Organismus zum Elektronentransfer ausgebildet werden (Reguera *et al.*, 2005). Allerdings zeigten Studien, dass *pilA*-Mutanten keine Probleme im Elektronentransport auf eine Elektrode hatten, wenn die Zellen im direkten Kontakt mit der Anode standen, jedoch aber bei der Ausbildung von dickeren Biofilmen. Somit kann vermutet werden, dass die Pili nicht direkt am Elektronentransfer beteiligt sind, sondern für die Verteilung der c-Typ-Cytochrome und die Steigerung des Elektronentransfers durch die bessere Ausbildung von Biofilmen (Bonanni *et al.*, 2012). Zudem konnte ebenso nachgewiesen werden, dass OmcS entlang der Pili lokalisiert ist und dort vermutlich für den direkten Elektronentransfer auf den Elektronenakzeptor Fe<sup>3+</sup>-oxid verantwortlich ist (Leang *et al.*, 2010). Bisher ist jedoch die eigentliche Funktion und Aufgabe der einzelnen, am extrazellulären Elektronentransfer in *G. sulfurreducens* beteiligten Proteine und Cytochrome noch nicht vollständig aufgeklärt. Auch die Interaktion der einzelnen Komponenten ist noch unklar, daher kann die Funktionsweise des Mechanismus nur angenommen werden (Abb. 6) (Bonanni *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2016). Auch *S. oneidensis* MR-1 bildet leitfähige Fortsätze für den extrazellulären Elektronentransfer über längere Distanzen aus. Jedoch konnte gezeigt werden, dass diese nicht aus Proteinen bestehen, sondern Ausstülpungen der äußeren Membran und des Periplasmas sind. Diese Ausstülpungen enthalten die am Elektronentransfer beteiligten Cytochrome und Proteine MtrA, MtrB, MtrC und OmcA und ermöglichen so den Transfer von Elektronen über gewisse Distanzen (Pirbadian *et al.*, 2014).

### 1.4.3. Vermittelter Elektronentransfer (METM)

Auch beim vermittelten Elektronentransfer (METM, engl. **mediated electron transfer mechanism**) geht es um das Überwinden von Distanzen zwischen Organismus und Elektronenakzeptor. Aber auch darum, dass einige Mikroorganismen nicht in der Lage sind Elektronen nach außen zu transportieren, da ihnen die verlängerte Elektronentransportkette fehlt. Daher nutzen viele Organismen den vermittelten extrazellulären Elektronentransfer über molekulare Redox-Verbindungen, sog. Mediatoren. Diese Mediatoren können zum einen endogene, lösliche Sekundärmetabolite sein, die vom Organismus selbst produziert werden und den Elektronentransport aus dem bakteriellen Stoffwechsel zu teilweise weit entfernten Elektronenakzeptoren übernehmen. Zu diesen Elektronenshuttle gehören Flavine oder auch Phenazine (Schröder *et al.*, 2015). In *S. oneidensis* MR-1 konnte gezeigt werden, dass der Organismus Flavine produziert, welche an der Zelloberfläche reduziert werden und dann über eine Komplexbildung mit dem Elektronenakzeptor, wie Fe<sup>3+</sup>-oxid oder auch lösliche Fe<sup>3+</sup>-Verbindungen, die Elektronen an diesen abgeben. Dabei werden sie selbst oxidiert und können wieder an der Zelloberfläche reduziert werden (Marsili *et al.*, 2008). Für den Transport aus der Zelle heraus, konnte in *S. oneidensis* ein Flavin-Adenin-Dinukleotid(FAD)-Transporter identifiziert werden (Kotloski & Gralnick 2013). Zudem wird beschrieben, dass Flavin-Moleküle, welche von *S. oneidensis* MR-1 sekretiert werden, als Redox-Cofaktoren für den Elektronentransport der Cytochrome der äußeren Membran dienen (Okamoto *et al.*, 2013). Der Stamm *Pseudomonas aeruginosa* KRP1 nutzt ebenfalls Mediatoren für den Elektronentransfer auf Anoden. In einem Experiment konnte gezeigt werden, dass der Transfer der Elektronen über die Mediatoren Pyocyanin und Phenazin-1-carboxamid ermöglicht wird. Mutationen, die dazu führten, dass beide Substanzen nicht mehr gebildet werden konnten, führten dazu, dass lediglich 5% der Stromausbeute, im Vergleich zum Wildtyp, erreicht wurden. Dies zeigt deutlich, wie essentiell diese Shuttles für die Übertragung der Elektronen auf einen Elektronenakzeptor sind (Rabaey *et al.*, 2005a). In der Natur kommt es oft vor, dass Bakterien für den extrazellulären Elektronentransport gelöste Huminstoffe verwenden und darüber die Elektronen auf Fe<sup>3+</sup>-oxide übertragen. Diese Stoffe gehören zu den exogenen Mediatoren und werden von Reduktasen an der Zelloberfläche reduziert (Roden *et al.*, 2010). Für die Erhöhung der Stromausbeute in mikrobiellen Brennstoffzellen, werden oft synthetische Mediatoren, wie Methylenblau oder Neutralrot eingesetzt (Zhang *et al.*, 2006). *E. coli* zählt beispielsweise zu den Mikroorganismen, welche diese synthetischen Mediatoren nutzen, um Elektronen zu übertragen. Experimente zeigten einen erheblichen Fortschritt in der MFC-Technologie, indem mikrobielle Brennstoffzellen mit *E. coli* und dem Mediator Neutralrot inokuliert wurden. Hierbei konnte eine beträchtliche Stromausbeute erzielt werden (Park & Zeikus, 2003). Aber auch mit dem Mediator Methylenblau können Elektronen von dem

Organismus auf die Anode übertragen werden (Wang *et al.*, 2010; Zou *et al.*, 2007; Sturm-Richter *et al.*, 2015).

## 1.5. Elektrochemisch aktive Mikroorganismen in mikrobiellen Brennstoffzellen

### 1.5.1. Organismen in Reinkulturen

Wie bereits im vorherigen Kapitel beschrieben, sind *Geobacter sulfurreducens* und *Shewanella oneidensis* MR-1 umfangreich erforschte exoelektrogene Mikroorganismen in Bezug auf den extrazellulären Elektronentransfer, aber auch in der MFC-Technologie. In zahlreichen Veröffentlichungen wurde die Leistungsfähigkeit der beiden Stämme hinsichtlich der Anodeninteraktion und der Stromproduktion in MFC's getestet (Biffinger *et al.*, 2009; Bretschger *et al.*, 2007; Kim & Lee, 2010; Yi *et al.*, 2009). Jiang *et al.* (2013) konnten nachweisen, dass eine Bakterienzelle *G. sulfurreducens* 90 fA Strom in einem MFC-Reaktor produzieren kann, zwei Zellen des Stamms produzierten 195 fA Strom. Diese Stromproduktion wurde bei direktem Kontakt des Organismus mit der Elektrode gemessen (Jiang *et al.*, 2013). Zudem konnten mit *G. sulfurreducens* Stromdichten erreicht werden, die mit 4,56 A/m<sup>2</sup> (Stromdichten pro m<sup>2</sup> Anodenoberfläche), zu den höchsten für Reinkulturen zählen (Nevin *et al.*, 2008). Mit *S. oneidensis* MR-1 wurde 2010 die Elektronentransferrate pro Zelle in einer Sekunde bestimmt. Hierbei wurden 1,3 x 10<sup>6</sup> e<sup>-</sup> pro Zelle und Sekunde auf die Elektrode übertragen (McLean *et al.*, 2010). Der Organismus zeigte jedoch in MFC-Versuchen eine Stromdichte von lediglich 50 mA/m<sup>2</sup> (Lanthier *et al.*, 2008). Auch fermentative Bakterien, wie Clostridien, welche als nicht-exoelektrogen galten, zeigen in Versuchen, dass sie in der Lage sind, Elektronen auf eine Anode zu übertragen. Hier wird angenommen, dass bei der Fermentation im Überfluss entstandene Elektronen auf Akzeptoren, wie eine Anode oder Fe<sup>3+</sup>-citrat übertragen werden können und diese dabei als Elektronensenke genutzt werden. Die genauen Mechanismen des Transfers sind jedoch ungeklärt (Dobbin *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2001). Bei der Verwendung von *E. coli* in MFC's wurde lange vermutet, dass die Zellen lediglich mithilfe von synthetischen Redox-Mediatoren Elektronen auf unlösliche Akzeptoren übertragen können. Zhang *et al.*, (2008) konnten zeigen, dass der Organismus solche Shuttle-Moleküle selbst synthetisiert und nicht auf die Zugabe von synthetischen Mediatoren angewiesen ist (Zhang *et al.*, 2008). Neben den genannten Organismen gibt es weitere, welche erst kürzlich als exoelektrogen, bzw. elektrochemisch aktiv identifiziert wurden. *Lysinibacillus sphaericus*, ein Gram-positives Bakterium, kann die verschiedensten Substrate (einfach oder komplex) metabolisieren und ist in der Lage in einer MFC über die Oxidation von Laktat Strom zu erzeugen. Die Elektronen werden mit Hilfe eines

noch unbekanntem Mediators oder c-Typ-Cytochroms auf die Anode übertragen. Es konnten Stromdichten bis zu  $270 \text{ mA/m}^2$  erreicht werden (He *et al.*, 2014; Nandy *et al.*, 2013). *Thermincola ferriacetica*, ein Gram-positives thermophiles Bakterium, zeigte ebenfalls Anodenatmung und die Ausbildung eines Biofilms mit Zellfortsätzen, ähnlich wie bei *G. sulfurreducens* (Parameswaran *et al.*, 2013). So konnte auch für *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter* sp. SX-1 und *Tolomonas osonensis* eine Art der Anodenatmung nachgewiesen werden. Allerdings sind hier die genauen zellulären Mechanismen bisher ungeklärt (Bhuvanewari *et al.*, 2013; Luo *et al.*, 2013; Xu & Liu, 2011). Die Vielfalt der Organismen, die eine elektrochemische Aktivität aufweisen ist sehr hoch. Jedoch bleiben die meisten Mechanismen bisher unaufgeklärt.

### 1.5.2. Mischkulturen

Es wurde bereits in einigen Veröffentlichungen gezeigt, dass Mischkulturen in mikrobiellen Brennstoffzellen in der Regel eine bessere Stromausbeute liefern, als Reinkulturen in solchen Systemen (Nevin *et al.*, 2008). Dieser Unterschied wird deutlich, wenn man Arbeiten von Rabaey *et al.* (2004) betrachtet. In einem ersten Versuch wurde ein bakterielles Konsortium etabliert, welches mit einer hohen Energieeffizienz Elektronen auf die Anode überträgt. Isolate dieser Mischkultur konnten anschließend als Reinkulturen in der MFC jedoch nur geringere Stromausbeuten erzielen (Nevin *et al.*, 2008; Rabaey *et al.*, 2005a; Rabaey *et al.*, 2004). Solch eine Steigerung ist auch zu sehen, wenn man die Stromdichten, der in 1.5.1. genannten Reinkulturen mit Mischkulturen aus der Literatur vergleicht. *S. oneidensis* erzeugt mit  $50 \text{ mA/m}^2$  (Lanthier *et al.*, 2008) im Vergleich zu Mischkulturen aus Abwasser, welche eine Stromdichte von  $1,05 \text{ A/m}^2$  oder  $1,3 \text{ A/m}^2$  erzeugen deutlich weniger Strom (Cheng *et al.*, 2006; Min & Logan, 2004; Nevin *et al.*, 2008). Es konnten sogar weitaus höhere Stromdichten mit einer Mischkultur aus Anreicherungen von anaeroben Faulschlammbehältern mit  $6 \text{ A/m}^2$  erreicht werden (Nevin *et al.*, 2008; Rabaey *et al.*, 2003). Dies ist jedoch unter Berücksichtigung unterschiedlicher Bedingungen, wie zum Beispiel Anoden- oder Kathodenmaterial oder der Art des Inokulums, zu sehen (Nevin *et al.*, 2008). Zudem wird angenommen, dass Bakterien, welche nicht exoelektrogen sind, sondern über Fermentierung die notwendige Energie gewinnen, eine Rolle als „Helfer“-Organismen in solchen Biofilmen übernehmen und für die Exoelektrogenen wichtige organische Säuren zur Verfügung stellen. Diese Produkte können dann für die Exoelektrogenen als Elektronendonoren dienen und sie können Anodenatmung betreiben. Eine solche Mischkultur könnte so die Leistung in mikrobiellen Brennstoffzellen zusätzlich erhöhen, bzw. für die größeren Stromausbeuten in Biofilmen mit unterschiedlichen Stämmen verantwortlich sein (Ren *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2012). Die Ausbildung von Biofilmen aus unterschiedlichen Organismen auf der Anode und deren Interaktion mit dieser

hätte demzufolge wichtige Auswirkungen auf die Planung und die Gestaltung von MFC's in der Anwendung. Ein sehr wichtiger Faktor bei der Leistung solcher Systeme ist jedoch auch der Aufbau der mikrobiellen Brennstoffzelle. Nevin *et al.* (2008) konnten zeigen, dass selbst mit einer Reinkultur von *G. sulfurreducens* eine enorme Stromdichte von  $4,56 \text{ A/m}^2$  erzielt werden konnte, was die Leistung mancher Mischkulturen übertrifft (Nevin *et al.*, 2008).

Die Leistung der Organismen oder Mischkulturen in mikrobiellen Brennstoffzellen ist jedoch schwer miteinander vergleichbar, da es große Unterschiede im Reaktor-Aufbau, bei den Arbeitsbedingungen und in der Verwendung der Anodenmedien gibt (Kumar *et al.*, 2016). Wie bereits beschrieben, wurden die verschiedensten Organismen für diverse Anwendungsgebiete verwendet. Im Folgenden Kapitel werden einige Anwendungen für mikrobielle Brennstoffzellen näher beschrieben.

## **1.6. Mikrobielle Brennstoffzellen in der Anwendung**

### **1.6.1. Mikrobielle Brennstoffzelle im Sediment**

Bei dieser Art der Anwendung von mikrobiellen Brennstoffzellen wird die Anode in das Sediment eines Sees oder Meeres eingebracht und die Kathode im darüber befindlichen Wasser. Dabei wird das im Sediment befindliche organische Substrat von Mikroorganismen oxidiert und die Elektronen auf die Anode übertragen. An der Kathode, welche sich im  $\text{O}_2$ -reichen Wasser über dem Sediment befindet, kann  $\text{O}_2$  reduziert werden (Tender *et al.*, 2002). Diese Redoxreaktionen an Anode und Kathode werden über einen natürlich vorkommenden Redox-Gradienten gewährleistet. Dieser Gradient entsteht aufgrund des  $\text{O}_2$ -reichen Wassers ( $\text{O}_2$  als Oxidationsmittel) und den unterschiedlichen Reduktionsmitteln, die in den ersten Schichten (mm bis cm) des Sediments vorkommen. Durch die unterschiedlichen Redoxreaktionen in den einzelnen Schichten, erhöht sich die Menge an Reduktionsmittel mit zunehmender Tiefe, so entsteht eine Potentialdifferenz zwischen Anode und Kathode und lässt die Reaktionen ablaufen (Lowy *et al.*, 2006). Die exoelektrogenen Bakterien, welche die Reaktionen an der Anode katalysieren, gehören beispielsweise zu der Familie der Geobacteriaceae oder der Desulfobulbaceae (Holmes *et al.*, 2004). In einem der ersten Freilandversuche wurde eine solche Brennstoffzelle im Meer installiert und konnte eine Leistung von 36 mW erbringen (Tender *et al.*, 2008). In einem weiteren Versuch konnte mit einer Graphit-Anode im Sediment und einer Graphit-Kathode eingebracht im Meerwasser eine Stromdichte von  $90 \text{ mA/m}^2$ , lediglich über das Mikrobiom des Sedimentes, ohne die Zugabe von Mediatoren, erreicht werden (Lowy *et al.*, 2006).

### 1.6.2. Bioremediation

Eine weitere Anwendung der MFC-Technologie ist die Bioremediation von kontaminierten Böden oder auch Grundwässern. So könnte beispielsweise erdölverseuchtes Grundwasser mithilfe einer solchen Technologie aufgereinigt werden. In einer Arbeit von Morris *et al.* (2007) konnte gezeigt werden, dass mikrobielle Konsortien in der Lage waren, Kohlenwasserstoffe aus Erdöl als Elektronendonator in MFC's zu verwenden und dabei Strom zu generieren (Morris & Jin 2007). Der exoelektrogene Organismus *Geobacter metallireducens* ist in der Lage Kontaminationsstoffe, wie Toluol oder auch Benzoate zu oxidieren, wenn eine Elektrode als Elektronenakzeptor dient (Bond *et al.*, 2002; Lovley, 2006).

### 1.6.3. Abwasseraufbereitung

Abwasser in Kläranlagen setzt sich aus industriellen, kommunalen und landwirtschaftlichen erzeugten Abwässern zusammen. Bevor dieses in die Seen und Flüsse eingeleitet werden kann, muss es gereinigt werden (Gude, 2016). Die herkömmliche Abwasseraufbereitung ist aus drei aufeinanderfolgenden Reinigungsschritten aufgebaut, welche der Abbildung 7 entnommen werden können. In einem ersten Schritt werden in der mechanischen Reinigungsstufe zunächst über einen Rechen grobe und sperrige Stoffe, wie Plastikteile oder Essensreste zurückgehalten. Durch die Herabsetzung der Fließgeschwindigkeit des Abwassers werden im darauffolgenden Sand- und Fettfang einmal grobe, absetzbare Verunreinigungen (Sand, kleine Steine oder Glassplitter) und auch Fette und Öle entfernt. Im Vorklärbecken hat das Abwasser eine lange Verweildauer, wodurch es zur Ruhe kommt und sich weitere ungelöste Feststoffe sedimentieren können. Dieser Primärschlamm wird dem Vorklärbecken entnommen und der Schlammbehandlung zugeführt. In der anschließenden biologischen Reinigungsstufe werden in einem sog. Belebungsbecken gelöste Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen entfernt. Diese Stufe besteht aus aeroben und anaeroben Prozessen. Unter oxidischen Bedingungen wird über das Belüften des Abwassers, welches mit dem Belebtschlamm (Mikroorganismen) versetzt ist, ein Großteil der organischen Kohlenstoffverbindungen zu CO<sub>2</sub> oxidiert und dabei Biomasse erzeugt. Zudem wird über Nitrifikation, das aus dem Abbau der Kohlenstoffverbindungen freigesetzte Ammonium zu Nitrit und im Anschluss zu Nitrat oxidiert. Im zweiten, anaeroben Prozess wird über Denitrifikation Nitrat zu molekularem Stickstoff reduziert. Dabei werden zusätzlich organische Kohlenstoffverbindungen oxidiert. Dieser Denitrifikationsprozess kann der Nitrifikation vorgeschaltet sein, sodass das Abwasser der Nitrifikation dem Becken, in dem die Denitrifikation stattfindet, wieder zugeführt wird. Die hierbei in großen Mengen entstandene Biomasse (Belebtschlamm), wird im Anschluss im Nachklärbecken über Sedimentation vom Abwasser abgetrennt. Um die

Konzentration an Mikroorganismen im Belebungsbecken ausreichend hoch zu halten wird der Belebtschlamm zum Großteil dem Belebungsbecken, als sog. Rücklaufschlamm zurückgeführt. Der Überschuss des Prozesses, auch Sekundärschlamm genannt (Biomasse-Zuwachs), wird zusammen mit dem Schlamm des Vorklärbeckens in den Voreindicker abgeführt. Im Anschluss wird der eingedickte Schlamm in Faulbehälter (falls vorhanden) überführt. In diesen Faulbehältern wird der Schlamm zu Faulgas und Faulschlamm abgebaut. Drei aufeinanderfolgende anaerobe Prozesse (enzymatische Hydrolyse, Fermentation und Methanogenese) produzieren hierbei hauptsächlich Methan und CO<sub>2</sub>. Das Biogas wird zur Erzeugung von Strom und Wärme genutzt. Der Faulschlamm kann entweder als Dünger verwendet werden, oder er wird verbrannt. Ist kein Faulbehälter vorhanden, kann der Schlamm direkt verbrannt werden. Für die Phosphorelimination im Abwasser werden Fällmittel eingesetzt, welche sowohl bei der Vorklärung, in der biologischen Reinigungsstufe oder aber auch in der Nachklärung eingesetzt werden können. Das gereinigte Abwasser kann den Einleitgewässern zugeführt werden (Gude, 2016; Madigan *et al.*, 2008; Hosang, 2013). Die beschriebene biologische Reinigungsstufe in der Abwasseraufbereitung ist jedoch kostenintensiv, da das Belebungsbecken für die aeroben Prozesse belüftet werden muss. Dieser Prozess kann bis zu 75% der Energiekosten einer Kläranlage ausmachen (Gude, 2016). Aus diesem Grund ist eines der wohl größten Anwendungsgebiete für mikrobielle Brennstoffzellen und auch das mit dem weitaus größten Interesse, die Abwasseraufbereitung. Wie bereits erwähnt ist Abwasser ein bisher ungenutzter Abfallstrom, indem viel Energie in Form von Molekülen steckt. Diese interne chemische Energie der Substanzen im Abwasser wird regelrecht verschwendet, indem sehr viel Energie in den Kläranlagen aufgebracht wird, um das Abwasser mit den darin enthaltenen energiereichen Verbindungen zu reinigen (Agler-Rosenbaum *et al.*, 2013; Heidrich *et al.*, 2011). 20% des kommunalen Stromverbrauchs in Deutschland ist auf die Kläranlagen zurückzuführen. Dies übertrifft den Stromverbrauch von kommunalen Einrichtungen, wie Schulen, Verwaltungsgebäuden oder auch Krankenhäusern (Fricke, 2009). In einem bundesweiten Leistungsvergleich von 2011 wird deutlich, dass der Stromverbrauch in deutschen Kläranlagen mit 4000 GWh pro Jahr sehr hoch ist. Im Durchschnitt ergibt sich dabei ein Stromverbrauch von 24 kWh pro Einwohner und Jahr. Im privaten liegt der Stromverbrauch bei 1000 kWh pro Einwohner und Jahr, was bedeutet, dass für die Abwasserreinigung ca. 2,4% des jährlichen Stromverbrauchs pro Einwohner benötigt wird. Das klingt im ersten Moment sehr wenig, aber auch hier können Energieeinsparungen vorgenommen werden. Daher ist das Ziel eine hohe Reinigungsleistung mit geringem Energieaufwand zu erlangen (DWA 2011). Bei einer solch energieeffizienten Reinigung könnten mikrobielle Brennstoffzellen (MFC) zukünftig eine wichtige Rolle spielen. Die Bakterien könnten die Substrate, welche im Abwasser enthalten sind, für ihren Metabolismus nutzen und dabei Strom produzieren. So könnte neben der Abwasserreinigung auch gleichzeitig eine Stromproduktion stattfinden.

Wie bereits erwähnt, steckt in den ungenutzten Verbindungen im Abwasser sehr viel nutzbare Energie für die Organismen. Heidrich und Kollegen (2011) haben diese interne Energie berechnet und kamen zu dem Ergebnis, dass in einer Probe von kommunalem Abwasser eine Energie von 7,6 kJ/L steckt. Im Vergleich dazu ergab eine gemischte Probe aus kommunalem und industriellem Abwasser einen Wert von 16,8 kJ/L. Zudem wurde berechnet, dass jährlich etwa 70-140 GW Energie, indem von uns produzierten Abwasser in Form von für Mikroorganismen theoretisch verwertbaren organischen Molekülen, steckt. Diese Berechnung bezieht jedoch nicht alle landwirtschaftlich und industriell produzierten Abwässer mit ein (Heidrich *et al.*, 2011). Industrielle Abwässer sind in dieser Technologie von besonderem Interesse, da deren Zusammensetzung oftmals konstant und definiert ist. Zudem ist die Konzentration an verwertbaren organischen Verbindungen oftmals höher, als in kommunalen Abwässern, da das Abwasser zum Beispiel aus Lebensmittelindustrien, wie Brauereien oder Zuckerraffinerien stammt (Agler-Rosenbaum *et al.*, 2013; Gude, 2016). In einigen Versuchen konnte bereits gezeigt werden, dass durch die Oxidation von Substraten aus industriellem oder kommunalem Abwasser, Strom produziert werden kann (Gil *et al.*, 2003; Liu & Logan, 2004). Für kommunales Abwasser konnte beispielsweise eine maximale Stromdichte von 0,977 A/m<sup>2</sup> erzielt werden. Dabei wurden mehr als 88% CSB abgebaut (bei einem max. CSB von 490 mg/L). Der CSB (**chemischer Sauerstoffbedarf**) ist der Summenparameter für alle unter bestimmten Bedingungen oxidierbaren Stoffe, indem er die Menge (mg/L) an Sauerstoff angibt, die für die Oxidation benötigt werden würde. Die Coulomb'sche Effizienz (CE) (Rabaey *et al.*, 2005b), welche die Menge an Elektronen angibt, die tatsächlich durch die Oxidation des CSB (Substrat in Form von CSB) auf die Anode übertragen wurden sind, beträgt hier ca. 47%. Die Versuche wurden in sog. Batch-Systemen durchgeführt, was bedeutet, dass man Abwasser in den MFC-Reaktor einbringt und dabei die Stromproduktion und den CSB-Verbrauch beobachtet. Das Abwasser wurde hier regelmäßig ausgewechselt, um das System mit frischem Substrat zu versorgen (Ahn und Logan, 2010). Mansoorian und Kollegen (2016) hingegen untersuchten industrielles Molkerei-Abwasser, welches mit 3620 mg/L einen hohen CSB-Wert aufwies. Die mikrobielle Brennstoffzelle wurde nicht, wie zuvor beschrieben, als Batch-System, sondern als Durchflusssystem betrieben. Über unterschiedliche Flussraten, mit denen das Abwasser durch das System gepumpt wurde, wurde der Einfluss auf die Leistung des Systems untersucht. Mit zunehmender Flussrate, d.h. niedriger HRT (**hydraulic retention time**), steigt die Konzentration an Substrat im Reaktor, was dazu führt, dass mehr Substrat umgesetzt wird und die Stromproduktion steigt. Die HRT gibt dabei die Verweilzeit des Abwassers im System an, bis es einmal komplett ausgetauscht ist. Hier konnte mit einer HRT von 5 Tagen die höchste Stromausbeute mit 0,79 A/m<sup>2</sup> und einer CE von 37,16% erreicht werden. In dieser Zeit wurden 90,46% CSB durch das System abgebaut. Mit einer Erhöhung der CSB-Konzentration sank jedoch die CE, da die mikrobielle Aktivität sich

verringerte (Mansoorian *et al.*, 2016). Wie anhand dieser beiden Beispiele zu sehen ist, kann Abwasser aus verschiedensten Quellen über eine solche Technologie aufgereinigt werden. Die Effizienz ist jedoch von verschiedenen Faktoren, wie zum Beispiel dem Reaktorvolumen, der Größe und Materialien der Elektroden, der Membran und auch der Zusammensetzung des Abwassers und dessen Leitfähigkeit abhängig (Rozendal *et al.*, 2008) und es bedarf weiterer Untersuchungen, bis diese Systeme in Kläranlagen zur Anwendung kommen können.

Der Einsatz einer mikrobiellen Brennstoffzelle als biologische Reinigungsstufe könnte somit diese immensen Kosten senken, da man sowohl Kohlenstoff- als auch Stickstoffverbindungen aus dem Abwasser über eine MFC entfernen kann. Hierbei wird im Anodenkompartiment über die anaerobe Anodenatmung der Großteil des Kohlenstoffs oxidiert. Mithilfe einer aeroben Biokathode konnte gezeigt werden, dass auch Stickstoffverbindungen, wie Ammonium ebenfalls in einer MFC abgebaut werden können, indem diese Reaktion im mit Sauerstoff versorgten Kathodenkompartiment erfolgt. Hier findet zum einen die aerobe Nitrifikation von Ammonium über Nitrit zu Nitrat statt, woran Nitrifizierer, wie zum Beispiel *Nitrosomonas europaea* oder *Nitrobacter* beteiligt sind, welche  $O_2$  als Elektronenakzeptor nutzen. Die Kathode wurde in diesem Experiment nicht als Elektronendonator genutzt, sondern als Oberfläche zur Anlagerung der Zellen und zur Ausbildung eines Biofilms (Kim *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2013). Biokathoden können auch für die Denitrifikation eingesetzt werden. In diesem Fall dienen sie als Elektronendonator und übertragen die Elektronen, welche durch die Oxidation der Kohlenstoffverbindungen im Anodenkompartiment auf die Anode übertragen wurden, auf das Nitrat (Jia *et al.*, 2008; Lefebvre *et al.*, 2008). Der Prozess der Nitrifikation und Denitrifikation kann zudem kombiniert werden. In einer Arbeit von Xie *et al.* (2011) konnte gezeigt werden, dass in einem kombinierten System, bestehend aus einer anoxischen Anode, einer oxischen und einer anoxischen Kathode, zunächst die Nitrifikation in der aeroben Biokathode stattfindet und das entstehende Nitrat im Anschluss in der anaeroben Biokathode unter der Aufnahme der Elektronen von der Kathode im Zuge der Denitrifikation in  $N_2$  umgewandelt wird (Xie *et al.*, 2011). Wie eine mikrobielle Brennstoffzelle in einer Kläranlage eingesetzt werden könnte, kann der Abbildung 7 entnommen werden.

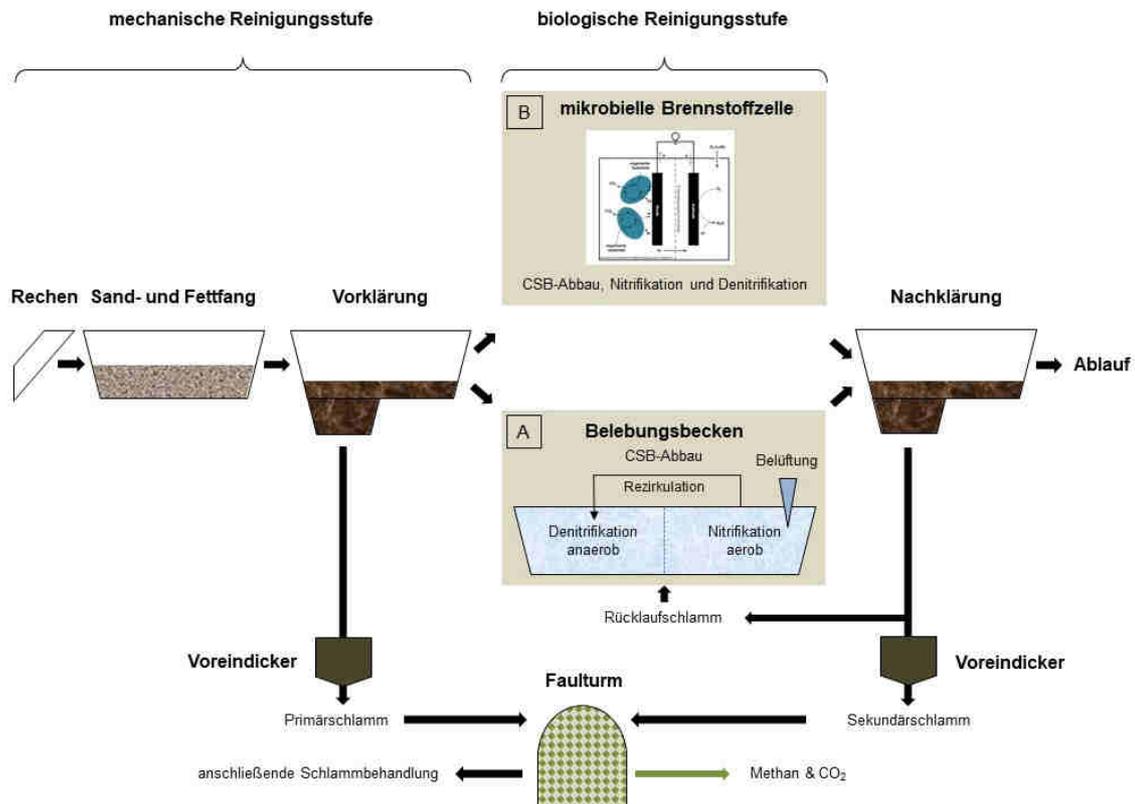


Abbildung 7: Vereinfachtes Schema einer kommunalen Kläranlage. A) Schema eines Klärwerks mit Belebungsbecken und der herkömmlichen biologischen Reinigungsstufe und einem Faulturm. B) Schema eines Klärwerks mit einer mikrobiellen Brennstoffzelle als biologische Reinigungsstufe und einem Faulturm zur Behandlung des Primär- und Sekundärschlammes.

Für die Behandlung von industriellem Abwasser könnte ein solches bioelektrochemisches System direkt im betriebseigenen Klärwerk zur Anwendung kommen, sodass das Abwasser mit einer geringeren Substratfracht in den Kanal und damit dem kommunalen Klärwerk zugeführt wird. Für die tatsächliche Anwendung von mikrobiellen Brennstoffzellen im Klärwerk gibt es jedoch einige Aspekte, welche die Leistung des Systems beeinträchtigen können. Zum einen besteht Abwasser aus einer Masse von unterschiedlichen organischen Substraten, welches ebenso einer Vielzahl an unterschiedlichen Mikroorganismen bedarf, die die Substrate verstoffwechseln. Zudem können komplexere Substrate nicht in demselben Maß abgebaut werden, wie die weniger komplexeren. Es konnte gezeigt werden, dass die elektrochemische Leistung in MFC's und BES im allgemeinen bei der Verwendung von echtem Abwasser geringer war als mit der Verwendung von synthetischem Abwasser (Liu & Logan, 2004; Rozendal *et al.*, 2008). Zudem gibt es mit der Methanogenese und den methanogenen Mikroorganismen eine starke Konkurrenz in mikrobiellen Brennstoffzellen, da diese Organismen und auch die Exoelektrogenen Substrate nutzen können, welche als Produkte des Gärstoffwechsels durch fermentierende Bakterien entstehen. Auch die Bakterien, die Fermentation betreiben, stehen damit in Konkurrenz zu den Exoelektrogenen. Diese Konkurrenz resultiert in einer

Abnahme der Leistung (Rozendal *et al.*, 2008). Bei der Verwendung von Glukose in der Brennstoffzelle konnte ein Elektronenverlust (Elektronen, welche nicht auf die Anode übertragen werden) von 16% (Chung & Okabe, 2009) oder 14-18% für Glukose und 0-6% für Acetat (Jung & Regan, 2011) aufgrund von Methanogenese und Fermentation beobachtet werden. Bei der Fermentation von Glukose wird möglicherweise  $H_2$  produziert, welches die Methanogenen verstoffwechseln können. Ebenso entsteht bei der Oxidation von Acetat durch Exoelektrogene  $CO_2$ , welches als Substrat für die Methanogenese dient und damit das Wachstum der Methanogenen in der Brennstoffzelle unterstützt (Parameswaran *et al.*, 2010). Abhängig von den bevorzugten Substraten können Methanogene in zwei Gruppen unterteilt werden, die hydrogenotrophen, welche Methan aus  $CO_2$  und  $H_2$  produzieren oder acetoklastische, welche Acetat als Substrat zur Methanherstellung metabolisieren. Zudem konnte auch eine Produktion von Methan bei der Verwendung von Ethanol beobachtet werden. Ethanol wird ebenfalls fermentiert, wobei  $CO_2$  und  $H_2$  entsteht (Torres *et al.*, 2007). Eine Steigerung der Stromproduktion konnte über eine Inhibierung der Methanogenese beobachtet werden, da der durch Fermentierung entstandene  $H_2$  in Abwesenheit der Methanogenen für die Stromproduktion genutzt werden konnte (Parameswaran *et al.*, 2010). Die Inhibierung der Methanogenese konnte unter anderem durch die Senkung der Temperatur im Anodenkompartiment auf  $4^\circ C$  oder  $9^\circ C$  im Vergleich zu  $25^\circ C$  in einer MEC inhibiert werden. Für die Stromproduktion bei solch niedrigen Temperaturen, ist jedoch ein psychrotoleranter Biofilm notwendig. Hier zeigte sich der psychrophile Stamm *Geobacter psychrophilus* als der leistungsfähigste exoelektrogene Organismus in dem System (Lu *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2012b). Zudem kann durch die Verwendung eines Durchfluss-Systems und die Senkung der HRT auch die Methanogenese gesenkt werden. Eine kürzere Verweildauer des Abwassers im Reaktor zeigte eine geringere Methanproduktion (Lu *et al.*, 2012a). Zudem ist der pH-Wert in bioelektrochemischen Systemen mit der Verwendung von Abwasser ein Faktor, der ebenfalls die Leistung senken kann. Während der Anodenrespiration werden Protonen gebildet, welche in einem ungepufferten System zu einer Senkung des pH-Wertes führen und damit zu einer geringeren Stromproduktion. In einer Arbeit von Torres *et al.* (2008) wurde angenommen, dass eine geringe Pufferkapazität des Anodenmediums eine Auswirkung auf die Transportrate der Protonen aus dem Biofilm hat und somit die Aktivität zur Elektronenübertragung beeinträchtigt wird. Bei einer Erhöhung der Pufferkonzentration von 12,5 auf 100 mM konnte die Stromdichte auf  $10 A/m^2$  vervierfacht werden. Ebenso konnte gezeigt werden, dass diese Erhöhung nicht aufgrund der erhöhten Leitfähigkeit des Mediums zustande kommt, sondern durch die geringere Inhibierung des Biofilms durch den sinkenden pH-Wert ( $< 6$ ) (Torres *et al.*, 2008). Viele industrielle und auch kommunale Abwässer haben einen alkalischen pH-Wert aufgrund von 50 - 200 mg/L  $CaCO_3$ , was in etwa 1 - 4 mM eines Phosphatpuffers entspricht. Somit stellt diese geringe Pufferkapazität,

aufgrund der Acidifizierung des Biofilms durch Bildung von Protonen, eine Einschränkung der Leistungsfähigkeit einer MFC dar. Eine mögliche Verbesserung könnte in diesem Fall ein Durchfluss-System, wie von Cheng *et al.* (2005) beschrieben, darstellen, indem die Anode regelmäßig mit frischem Abwasser versorgt wird. Dadurch wird das System kontinuierlich mit Puffer versorgt und der pH-Wert im Biofilm der elektrochemisch aktiven Mikroorganismen kann weitestgehend stabilisiert werden (Rozendal *et al.*, 2008). Eine weitere Herausforderung für die Nutzung von Brennstoffzellen in einem Klärwerk wird der größere Maßstab sein, den die MFC's für die Anwendung aufweisen sollten. Solche Anoden- und Reaktor-Vergrößerungen bringen nicht immer automatisch eine gute Leistung und Effizienz des Systems mit sich, da man größere elektrische Verluste und Überpotentiale zu verzeichnen hat. Eine Methode für eine effiziente Maßstabsvergrößerung sind daher stapelbare Module, wobei jedes Modul eine einzelne Brennstoffzelle darstellt. So konnte bereits erfolgreich ein Pilotprojekt über 6 Monate gestartet werden, indem 5 Module miteinander kombiniert, ein 90 L-System für die Aufreinigung von Brauereiabwasser darstellten. Dieses System wurde ohne zusätzlichen Energieeintrag betrieben (Dong *et al.*, 2015). Ein weiterer wichtiger Punkt für die Anwendung ist ein sog. Life Cycle Assessment (LCA), welches eine Aussage über die Rentabilität des MFC-Systems trifft. Die ökologische Leistung und der Kostenfaktor müssen gut kalkuliert und genau bekannt sein, um das System als alternative Abwasseraufbereitungs-Technologie nutzen zu können. Hierbei sind vor allem die Anoden- und Kathodenmaterialien, wie auch die Materialien für die Stromkollektion ein großer Kostenfaktor. Daher ist es notwendig günstige alternative Elektrodenmaterialien zu testen, welche keinen Einfluss auf die Leistung des Systems haben (Gude, 2016).

## 1.7. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Aufbereitung von industriellem Abwasser eines Chemieunternehmens und die gleichzeitige Stromproduktion über ein bioelektrochemisches System. Hierfür sollten in einem ersten Schritt exoelektrogene Mikroorganismen aus industriellem und kommunalem Abwasser isoliert werden, welche in der Lage sind, die in dem Abwasser vorhandenen Kohlenstoffverbindungen zu oxidieren. Die dabei entstehenden Elektronen sollten auf die Anode einer mikrobiellen Brennstoffzelle im 3-Elektroden-Messprinzip (M3C) übertragen werden. Bei diesem chemisch-biologischen Prozess entsteht zusätzlich Energie in Form von Strom. Nach der Isolierung sollten die Organismen hinsichtlich ihrer Leistung zur Stromproduktion und Substrat-Oxidation in der M3C zunächst in einem Batch-Verfahren getestet werden. Hierfür wurden nicht nur die Isolate, sondern auch der exoelektrogene Laborstamm *Geobacter sulfurreducens* (Barcode) in den Brennstoffzellen kultiviert. Dieser stellt aufgrund seiner Fähigkeit, Acetat anaerob zu metabolisieren, den optimalen Organismus zu Aufbereitung des Abwassers dar, da Acetat die Hauptkomponente an organischen Kohlenstoffverbindungen in dem industriellen Abwasser bildet. Für eine mögliche Optimierung der Leistung des Systems sollten neben den Batch-Experimenten zusätzlich Durchfluss-Experimente durchgeführt werden. Zudem sollte in weiterführenden Analysen die Interaktion der Organismen mit der Anode näher untersucht werden. Hierfür wurde zunächst eines der Isolate *Clostridium* sp. I bezüglich seiner Fähigkeit zur  $\text{Fe}^{3+}$ -Reduktion, Gärung und Anodenrespiration näher charakterisiert, da dieser Organismus die größte Menge  $\text{Fe}^{3+}$  innerhalb von 24 h reduzieren konnte. Über eine Transkriptomanalyse sollten die zellulären Mechanismen und Unterschiede der Batch- und Durchflusseexperimente weitestgehend aufgeklärt und die darin stattfindenden Stoffwechselforgänge der Organismen identifiziert werden. In einem letzten Versuch wurde die Adaptationsfähigkeit des Laborstammes an das industrielle Abwasser untersucht.

## 2. Material

### 2.1. Abwasser

#### 2.1.1. Emschergenossenschaft

Die Emschergenossenschaft ist ein Wasserwirtschaftsverband, der unter anderem verantwortlich ist für die Abwasserreinigung und den Grundwasserschutz im Emscher-Einzugsgebiet (Essen, Nordrhein-Westfalen). Für die Isolierung von exoelektrogenen Mikroorganismen wurde zunächst das gewerblich-kommunale Mischabwasser des Ablaufs der Vorklärung, vom Standort Dinslaken, herangezogen. Zum Zeitpunkt der Entnahme (26.02.2014) hatte das Abwasser einen pH-Wert von 7,98.

#### 2.1.2. Solvay

Die Firma Solvay, ein Chemieunternehmen mit Standort in Freiburg (Breisgau), produziert unter anderem den Ausgangsstoff für Celluloseacetat-Filter oder auch Polymerwerkstoffe aus Celluloseacetat. Auch hier wurden Abwasserproben von verschiedenen Standorten des firmeninternen Klärwerks (Grobdosierung=GD, hinter Absetzzyklon=hA) für die Isolierung von exoelektrogenen Mikroorganismen und für die Analyse des Abwassers entnommen. Zum Zeitpunkt der ersten Probenentnahme (16.04.2014) hatte das Abwasser der Grobdosierung einen pH-Wert von 7,45 und eine Temperatur von 42,9°C, das Abwasser hinter dem Absetzzyklon hatte einen pH-Wert von 8,1 und eine Temperatur von 40°C.

## 2.2. Bakterienstämme

Tabelle 1: Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp
<i>Geobacter sulfurreducens</i> Barcode	Wildtyp mit synthetischer Sequenz 453226:kan Barcode
<i>Clostridium</i> sp. I	Wildtyp
<i>Clostridium</i> sp. II	Wildtyp
<i>Paenibacillus</i> sp.	Wildtyp
<i>Escherichia coli</i> sp. ( <i>E. coli</i> )	Wildtyp

*G. sulfurreducens* ist ein Laborstamm mit einer synthetischen DNA-Sequenz im Genom, die als Barcode für die Quantifizierung der Organismen über quantitative PCR dienen kann. Diese Barcode-Integration wurde von Dolch *et al.* (2015) durchgeführt. Alle weiteren Stämme (Isolate) stammen aus dem Abwasser der Firma Solvay und wurden im Laufe dieser Arbeit isoliert.

## 2.3. Chemikalien, Enzyme, Reagenzien und Kits

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Roth (Karlsruhe), VWR (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Steinheim), Life Technologies (Darmstadt), Merck (Darmstadt), AppliChem (Darmstadt) bezogen. Die verwendeten Enzyme Reagenzien und Kits sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Enzyme, Reagenzien und Kits.

Produkt	Hersteller
1 kb DNA Ladder	New England BioLabs (Frankfurt/Main)
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	AppliChem (Darmstadt)
50 bp DNA Ladder	New England BioLabs (Frankfurt/Main)
6 x DNA Loading Dye Solution	Fermentas (St. Leon-Rot)
Ammonium Küvetten-Test (LCK 304)	Hach-Lange (Düsseldorf)
Citiflour AF1	Citiflour Lt. (London, England)
DNA-free™ Kit	Thermo Fischer (Waltham, USA)
innuPrep Stool DNA Kit	Analytik Jena (Jena)
iProof High-Fidelity Polymerase	Biorad (München)
LifeGuard™ Soil Preservation Solution	MoBio (Carlsbad, USA)
Mango Mix	Bioline (Luckenwalde)
MessageAmp™ II-Bacteria Kit	Thermo Fischer (Waltham, USA)
MICROBExpress™ Kit	Thermo Fischer (Waltham, USA)
MidoriGreen	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Mix2Seq Kit	mwg eurofins (Ebersberg)
Nitrat Küvetten-Test (LCK 339)	Hach-Lange (Düsseldorf)
Nitrit Küvetten-Test (LCK 342)	Hach-Lange (Düsseldorf)
Qubit® dsDNA High-Sensitivity Kit	Invitrogen
RNA PowerSoil® Total RNA Isolation Kit	Quiagen (Hilden)
SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix	Biorad (München)

SuperScript® DoubleStranded cDNA Synthesis Kit	Thermo Fischer (Waltham, USA)
Vectashield H1000	Linaris (Wertheim)
Wizard® SV Gel and PCR Clean up System	Promega (Mannheim)

## 2.4. Primer

In Tabelle 3 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Primer und deren Sequenzen aufgelistet. Die Primerpaare 1 bis 5 wurden für verschiedene Versuche, je nach Zielgruppe, verwendet.

*Tabelle 3: Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer.*

Primerpaare	Sequenz 5' → 3'	Zielgruppe
1) 27F Universal1492R	GAGTTTGATCCTGGCTCA GGTTACCTTGTTACGACTT	Bacteria 16S Bacteria 16S
2) 27F (degeneriert) 1525R (degeneriert)	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG AGAAAGGAGGTGWTCCARCC	Bacteria 16S Bacteria 16S
3) 341F 805R	CCTACGGGNGGCWGCAG GACTACHVGGGTATCTAATCC	Bacteria 16S Bacteria 16S
4) G.s. barcoding qPCR for G.s. barcoding qPCR rev	CGGTTCTATCGACCTACC CTGCTTGATGAACGAGAG	<i>G. sulfurreducens</i> (Barcode) <i>G. sulfurreducens</i> (Barcode)
5) G.s. Genom for G.s. Genom rev	AACGACCTGCTCAGCCTG TTTCAGGGCCTCATCCTGG	<i>G. sulfurreducens</i> <i>G. sulfurreducens</i>

## 2.5. Sonden

Die für die Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (FISH) verwendeten Sonden, deren Sequenz und die Zielgruppe sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Alle in dieser Arbeit verwendeten Sonden.

Sonden/ Bindestelle	Sequenz 5' → 3'	Zielgruppe	Quelle
Ent/ 16S rRNA	CCCCWCTTTGGTCTTGC	Enterobacteriaceae	(Kempf <i>et al.</i> , 2000)
LGC/ 16S rRNA	TCACGCGGCGTTGCTC	Firmicutes	(Küsel <i>et al.</i> , 1999)
Geo_2/ 16S rRNA	GAAGACAGGAGGCCCGAAA	<i>G. sulfurreducens</i>	(Richter <i>et al.</i> , 2007)
HGeo_2.1/ Helfersonde 1 für Geo_2	GTCCCCCCTTTTCCCGCAAGA	<i>G. sulfurreducens</i>	(Richter <i>et al.</i> , 2007)
HGeo_2.2/ Helfersonde 2 für Geo_2	CTAATGGTACGCGGACTCATCC	<i>G. sulfurreducens</i>	(Richter <i>et al.</i> , 2007)
EUB338-1/ 16S rRNA	GGTTACCTTGTTACGACTT	Eubacteria	(Richter <i>et al.</i> , 2007)

## 2.6. M3C-Reaktor (3-Elektroden-Messprinzip)

Für die Untersuchung der Fähigkeit der Organismen zur Stromproduktion und Verwertung der organischen Substanzen im Abwasser wurde ein MFC-Reaktor mit einem Volumen von 280 ml, wie in Abbildung 8 dargestellt, verwendet (entworfen von Frederik Golitsch (Golitsch, 2016)). Dabei handelt es sich um einen Zwei-Kammer-Aufbau mit einem 3-Elektroden-Messprinzip (M3C). Durch diesen Zwei-Kammer-Aufbau kommt es zu einer Kompartimentierung von Anoden- und Kathodenreaktionsraum, d.h. die Anode (Arbeitselektrode) und die Kathode (Gegenelektrode) sind räumlich voneinander getrennt. Die Anode bestand aus Graphitvlies (SIGRACELL® Carbon, GFD 2,5 EA, SGL Group; Wiesbaden) mit einer Dicke von 2,5 mm, Länge von 3,5 cm und Breite von 6 cm. Aufgrund der Hydrophobie des Vlieses wurden die zugeschnittenen Stücke zunächst in Isopropanol getränkt und anschließend dreimal mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gewaschen. Durch die Anode wurde eine Kanüle (0,80 x 120 mm; B. Braun, Melsungen) mittig der Länge nach gefädelt und auf den Arbeitselektrodenhalter gespannt. Die

Kanüle diente dabei als Kontaktierung über einen Bananenstecker an den Potentiostaten. Als Kathode wurde ein Platinnetz mit einer Breite von 5 mm und einer Länge von 10 mm (1024 Maschen pro  $\text{cm}^2$ ; Durchmesser von 0,06 mm; Chempur, Karlsruhe) verwendet. Über einen Platindraht (0,1 x 110 mm; Chempur, Karlsruhe) war dieser mit einer Edelstahlschraube verbunden, die ebenfalls über einen Bananenstecker der Kontaktierung der Kathode an den Potentiostaten diente. Die Kathode wurde in einen Gegenelektrodenhalter eingebaut, in den auch die Protonen-Austausch-Membran (fumapem F-950, 50  $\mu\text{m}$  Dicke, Durchmesser 1,9 cm, Fumatech; Bietigheim-Bissingen) über eine Schraubvorrichtung eingebracht wurde. Das Kompartiment wurde im Anschluss mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  befüllt, um die Dichtigkeit der Membran zu testen. Das Volumen des Kathodenkompartiments betrug ca. 10 ml. Vor der Verwendung wurden Anode und Kathode über ein Multimeter bei 200  $\Omega$  auf ihre Kontaktierung geprüft. Die Anoden- und Kathodenhalterung wurden im Anschluss mit Dichtungsringen in den Deckel eingeschraubt. Zudem wurden zum einen der Referenzelektrodenhalter und vier Beprobungsstutzen, ebenfalls mit Dichtungsringen, in den Deckel eingebaut. Die Beprobungsstutzen wurden mit Schraubdeckel und Dichtungen versehen. Das Glasgefäß (Borosilikatglas, DURAN; Mainz) wurde nun mit ca. 270 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  aufgefüllt und zusätzlich mit einem Magnetrührstab (L = 1,5 cm,  $\varnothing$  = 0,5 cm, Roth) versehen. Der Reaktordeckel mit allen Halterungen wurde auf das Glas aufgesetzt und mit Schrauben auf der Bodenplatte verschraubt. Alle Öffnungen wurden nun mit Alufolie bedeckt und der Reaktor autoklaviert. Als Referenzelektrode wurde eine gesättigte Silber-Silberchlorid-Elektrode (Ag/AgCl-Elektrode) (Sensortechnik Meinsberg GmbH; Ziegra-Knobelsdorf) verwendet und vor Gebrauch für ca. 30 min mit UV-Licht (365 nm, Benchtop UV Transilluminator, UVP; Cambridge, UK) sterilisiert. Zudem wurde sie gegenüber einer Bezugs-Referenzelektrode (ebenfalls eine Ag/AgCl-Elektrode) auf ihre Genauigkeit hin überprüft.

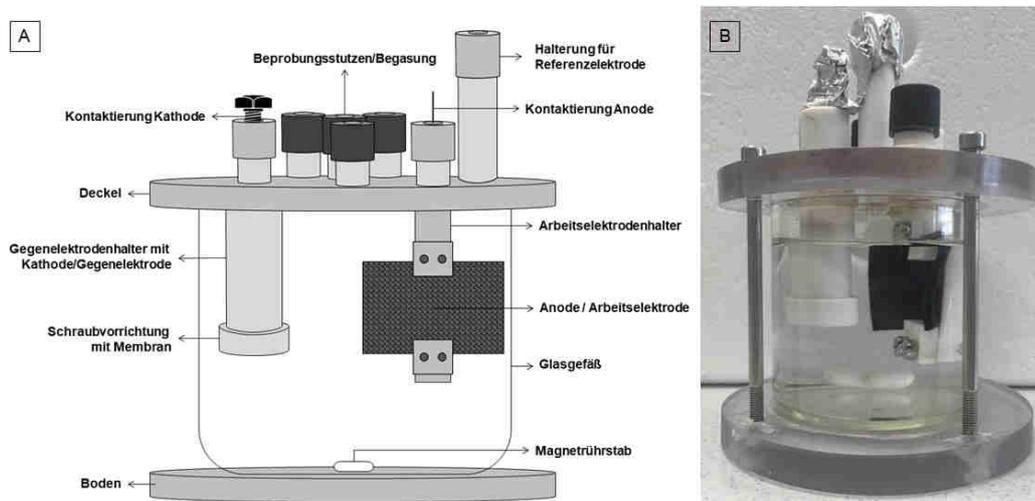


Abbildung 8: M3C-Reaktor mit einem Volumen von 280 ml. A) Schematische Darstellung mit Beschriftung der einzelnen Bestandteile. B) Zusammengebauter und autoklavierter Reaktor.

### 3. Methoden

#### 3.1. Isolierungskampagnen und Kulturmedien von potentiell exoelektrogenen Mikroorganismen aus den verschiedenen Abwässern

In dieser Arbeit sollten zunächst Mikroorganismen aus den verschiedenen Abwässern isoliert werden, die in der Lage sind, in einer mikrobiellen Brennstoffzelle, Elektronen auf eine Anode zu übertragen. Diese sogenannten exoelektrogenen Mikroorganismen, wie bereits in 1.4. (extrazellulärer Elektronentransfer (EET) in MET) beschrieben, können ihre Elektronen auch auf unlösliche  $e^-$ - Akzeptoren, wie  $Fe^{3+}$ , übertragen. Für die Isolierung wurde daher ein anaerobes Nährmedium verwendet (siehe Tab. 5), welches  $Fe^{3+}$  in Form von  $Fe^{3+}$ -Citrat als  $e^-$ - Akzeptor enthält. Der Vorteil dieser Substanz ist, dass sie in oxidiertes Form ( $Fe^{3+}$ ) eine rot-bräunliche Farbe aufweist und reduziert, als  $Fe^{2+}$ , farblos ist. Als  $e^-$ - Donoren wurden drei verschiedene organische Säuren, Acetat, Laktat und Propionat, verwendet um möglichst viele potentiell exoelektrogenen Organismen isolieren zu können. Für die Herstellung des Mediums (siehe Tab. 5) wurden zunächst 9,8 g  $Fe^{3+}$ -Citrat in ca. 100 ml  $H_2O_{dd}$  in der Mikrowelle aufgekocht, bis die Substanz komplett gelöst war. Im Anschluss wurde die Lösung unter Rühren abgekühlt und mit 1 M NaOH langsam auf pH 7,0 titriert. Alle Komponenten wurden nach und nach dazugegeben und bevor das Volumen auf 980 ml mit  $H_2O_{dd}$  aufgefüllt wurde, wurde der pH erneut auf 7,0 eingestellt. Das Medium wurde in eine Flasche abgefüllt, ein Rührfisch wurde zugegeben, mit einem Gummistopfen und Lochdeckel (Anaerobdeckel) verschlossen und unter Rühren aufgekocht. Über zwei Kanülen im Deckel konnte der Sauerstoff aus dem Medium entweichen. Da es sich hierbei um ein  $CO_2$ -gepuffertes Medium handelt, wurde im Anschluss für 30 min mit  $N_2 / CO_2$  (80% / 20%) begast und das Medium danach autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurden einige Lösungen (nicht hitzestabile Lösungen) komplementiert (Tab. 5) und der pH-Wert mit steriler, anaerober 1 M NaOH oder steriler, anaerober 1 M HCl eingestellt. Mit einer sterilen Spritze mit aufgesetzter steriler Kanüle wurden ca. 0,5 ml des Mediums entnommen und der pH-Wert gemessen (FiveEasy, pH Sonde InLab Micro; Mettler-Toledo Gießen). Abhängig von dem gemessenen pH-Wert, wurde dem Medium entsprechend 1 M NaOH oder 1 M HCl zugegeben. Dies wurde so lange wiederholt, bis der pH-Wert von 7,2 eingestellt war. Das Medium wurde bei RT im Dunkeln gelagert.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Fe<sup>3+</sup>-Citrat-Medium (Dolch et al., 2015).

Fe <sup>3+</sup> -Citrat-Medium	Menge pro L	Endkonzentration
Fe <sup>3+</sup> -Citrat	9,8 g	40,0 mM
auf pH 7,0 einstellen		
10 x Salze (Tab. 6)	100,0 ml	
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	0,213 g	1,0 mM
NaHCO <sub>3</sub>	1,8 g	21,0 mM
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,5 g	5,0 mM
Laktat (50%, w/w)	4,48 g	20,0 mM
NaAcetat	0,82 g	10,0 mM
NaPropionat	0,42 g	4,4 mM
Spurenelemente (Tab. 7)	10,0 ml	
Selenit-Wolframat (Tab. 8)	1,0 ml	
auf pH 7,0 einstellen		
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	ad 980,0 ml	
aufkochen, abkühlen, begasen, autoklavieren		
komplementieren:		
Vitaminlösung (Tab. 9)	10,0 ml	
Hefeextrakt (10%)	10,0 ml	0,1%
0,5 M Cystein	2,0 ml	1,0 mM
0,2 M NaAscorbat	1,0 ml	0,2 mM
0,4 M CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	1,0 ml	0,4 mM
auf pH 7,2 einstellen		

Die Salze wurden in 10-facher Konzentration in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gelöst (Tab. 6) und autoklaviert. Für die Herstellung der Spurenelemente-Lösung (Tab. 7) wurde zunächst die Nitrilotriessigsäure in ca. 700 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gelöst und mit KOH auf einen pH-Wert von 6,5 eingestellt. Nachfolgend wurden alle weiteren Salze zugegeben, auf 1 L mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> aufgefüllt und autoklaviert. Die Spurenelemente-Lösung wurde bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Für die Selenit-Wolframat-Lösung (Tab. 8) wurden alle Salze eingewogen und auf 1 L mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> aufgefüllt.

Tabelle 6: Zusammensetzung der 10 x Salze.

10 x Salze	Einwaage [g]	Endkonzentration [mM]
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	4,2	30,0
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	2,2	10,0
$\text{NH}_4\text{Cl}$	2,0	40,0
KCl	3,8	50,0
NaCl	3,6	60,0
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$	ad 1 L	

Tabelle 7: Zusammensetzung der Spurenelemente.

Spurenelemente	Einwaage [g]	Endkonzentration
Nitritotriessigsäure	2,14	11,2 mM
auf pH 6,5 einstellen (KOH)		
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,1	0,5 mM
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,3	1,1 mM
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,17	0,7 mM
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,2	0,7 mM
$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,3	1,8 mM
$\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	0,005	10,5 $\mu\text{M}$
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,005	80,9 $\mu\text{M}$
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,11	0,5 mM
$\text{NiSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,11	0,4 mM
$\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,2	0,6 mM
auf pH 7,0 einstellen		
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$	ad 1 L	

Tabelle 8: Zusammensetzung der Selenit-Wolframat-Lösung.

Selenit-Wolframat	Einwaage [g]	Endkonzentration
NaOH	0,5	13,0 mM
$\text{Na}_2\text{SeO}_3$	0,003	17,0 $\mu\text{M}$
$\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,004	12,0 $\mu\text{M}$
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$	ad 1 L	

Die zu komplementierenden Lösungen wurden wie folgt hergestellt:

Alle Bestandteile der Vitaminlösung (Tab. 9) wurden nacheinander in Reinstwasser gelöst und auf 1 L mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> aufgefüllt. Die Lösung wurde im Anschluss in eine sterile Flasche steril filtriert (0,2 µm Porengröße) und anaerobisiert, indem mit einer Anaerobisierungsanlage immer wieder die Gasphase getauscht wurde. Hierbei wurde mit sterilem Stickstoff (99% N<sub>2</sub>) begast und unter Vakuum wieder entgast. Solch ein Zyklus dauert ca. 2 min und für die Anaerobisierung der Lösung wurden 20 Zyklen unter Schütteln (150 rpm) gefahren. Die Vitaminlösung wurde bei 4°C im Dunkeln gelagert. Die Hefeextrakt-Lösung (10%) und die Cystein-Lösung (0,5 M) mussten, wie auch die Vitaminlösung, in sterile Flaschen steril filtriert werden und im Anschluss ebenfalls steril anaerobisiert werden (mit 99% N<sub>2</sub>). Bei der Herstellung der 0,5 M Cystein-Lösung wurde vor dem Auffüllen der gewünschten Menge an Lösung mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> der pH-Wert mit 3 M NaOH auf 8,6 eingestellt. Die Lösung wurde nach dem sterilen Anaerobisieren bei 4°C gelagert. Die NaAscorbat-Lösung (0,2 M) und die Kalziumchlorid-Lösung (0,4 M) hingegen konnten in Flaschen mit Gummistopfen und Anaerobdeckel gefüllt, anaerobisiert (siehe Vitaminlösung) und autoklaviert werden.

*Tabelle 9: Zusammensetzung der Vitamin-Lösung.*

<b>Vitaminlösung</b>	<b>Einwaage [mg]</b>	<b>Endkonzentration [µM]</b>
Biotin	2,0	8,1
Folsäure	2,0	4,5
Pyridoxin-HCl	10,0	48,6
Thiamin-HCl	5,0	14,8
Riboflavin	5,0	13,3
Nicotinsäure	5,0	40,6
DL-CaPantothentat	5,0	10,5
Vitamin B <sub>12</sub>	0,1	0,07
p-Aminobenzoessäure	5,0	36,5
Liponsäure	5,0	24,2
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	ad 1 L	

Für die Anreicherung und Kultivierung der Mikroorganismen im kleineren 10 ml-Maßstab wurden sterile, anaerobe Hungates mit einer sterilen Spritze mit aufgesetzter steriler Kanüle mit 10 ml Medium befüllt. Im Anschluss wurde die Gasphase der befüllten Hungates ausgetauscht, indem für 5 min mit N<sub>2</sub> / CO<sub>2</sub> (80% / 20%) und einer Ausgleichskanüle für den Gasaustrom begast wurde. Für

größere Volumina (50 ml – 250 ml) wurde mittels Gasdruck ( $N_2 / CO_2$  (80% / 20%)) das Medium von einer Flasche in eine andere überführt. Hierfür wurde eine sog. Doppelkanüle, ein Adapter zum Aufstecken auf die verwendeten Kanülen, eingesetzt. Es wurde steril  $N_2 / CO_2$ -Gasdruck auf die Flasche mit dem Medium gegeben, in der noch eine zusätzliche Ausgleichskanüle zum Aufsetzen des Adapters eingebracht war. Auf den Adapter wurde eine weitere Kanüle aufgesetzt, die wiederum in die zu befüllende sterile, anaerobe Flasche eingebracht wurde. Die zu befüllende Flasche wurde zunächst lediglich mit Hilfe einer Ausgleichskanüle steril begast, um die Gasphase zu wechseln. Dann wurde die Mediumsflasche so gehalten, dass das Medium in die zu befüllende Flasche läuft. Bei Erreichen der gewünschten Volumina, wurde zunächst die Mediumsflasche wieder abgestellt, sodass kein Medium mehr in die zu befüllende Flasche nachlaufen konnte. Dann wurde in der befüllten Flasche die Ausgleichskanüle gezogen und im Anschluss die Doppelkanülen-Kanülen-Konstruktion der befüllten Flasche. Nun konnte auch in der Mediums-Flasche die Doppelkanülen-Kanülen-Konstruktion entfernt und dann der Gasdruck auf die Flasche ausgeschaltet werden.

Für die Herstellung von anaeroben Agarplatten wurden 196 ml des  $Fe^{3+}$ -Citrat-Grundmediums (siehe Tab. 11) steril entnommen und in eine 250 ml - Flasche mit 2,0 g Agar-Agar gegeben. Sie wurde mit einem Gummistopfen und Anaerobdeckel verschlossen, unsteril anaerobisiert (siehe Vitaminlösung) und autoklaviert. Direkt nach dem Autoklavieren wurde der noch heiße  $Fe^{3+}$ -Citrat-Agar mit dem Medium auf  $60^\circ C$  gestellt, um ein Polymerisieren zu verhindern. Nach dem Abkühlen des Agars auf  $60^\circ C$  wurde mit den in Tabelle 10 aufgeführten Lösungen komplementiert und erneut auf  $60^\circ C$  gestellt. Nach ca. 20 min wurden die Agarplatten anaerob im Anaerobenzelt (Coy Laboratories; Grass Lake, USA) gegossen. Aufgrund des  $CO_2$ -gepufferten Systems im Medium mussten die Platten unter  $CO_2$ -Atmosphäre aushärten. Dies wurde gewährleistet, indem 1,68 g  $NaHCO_3$  mit 5 ml 1 M HCl in einer Petrischale überschichtet wurde, diese mit den frisch gegossenen Platten in einen Anaerobentopf gestellt wurde und der Topf verschlossen wurde. Bei dieser Reaktion wird  $CO_2$  freigesetzt, sodass die Atmosphäre im Anaerobentopf ebenfalls 80%  $N_2$  / 20%  $CO_2$  enthielt. Der  $N_2$  kam hierbei aus der Atmosphäre des Anaerobenzelts. Die Platten wurden UN aushärten gelassen. Die Agarplatten konnten bis zur Verwendung, mit Parafilm umschlossen, in einem Kühlschrank im Anaerobenzelt gelagert werden.

Tabelle 10: Zusammensetzung des Fe<sup>3+</sup>-Citrat-Agars.

<b>Fe<sup>3+</sup>-Citrat-Agar</b>	<b>Menge pro 200 ml</b>	<b>Endkonzentration</b>
Fe <sup>3+</sup> -Citrat-Grundmedium (Tab. 11)	196 ml	
Agar-Agar	2,0 g	1%
anaerobisieren, autoklavieren		
komplementieren:		
Vitaminlösung (Tab. 9)	2,0 ml	
Hefeextrakt (10%)	2,0 ml	0,1%
0,5 M Cystein	0,4 ml	1,0 mM
0,2 M NaAscorbat	0,2 ml	0,2 mM
0,4 M CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	0,2 ml	0,4 mM
auf 60°C bis zum Gießen warmhalten		

Für die Herstellung des Fe<sup>3+</sup>-Citrat-Grundmediums (Tab. 11) wurden ebenfalls zunächst 9,8 g Fe<sup>3+</sup>-Citrat in ca. 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> in der Mikrowelle aufgeköcht, bis die Substanz komplett gelöst war. Im Anschluss wurde die Lösung unter Rühren abgekühlt und mit 1 M NaOH langsam auf pH 7,0 titriert. Alle Komponenten wurden nach und nach dazugegeben und bevor das Volumen auf 980 ml mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> aufgefüllt wurde, wurde der pH erneut auf 7,0 eingestellt. Danach konnte das Medium direkt autoklaviert und nicht, wie zuvor, zunächst anaerobisiert werden. Dies ist hier nicht notwendig, da erst anaerobisiert wurde, an dem Tag, an dem die Agarplatten gegossen wurden.

Tabelle 11: Zusammensetzung des Fe<sup>3+</sup>-Citrat-Grundmediums.

<b>Fe<sup>3+</sup>-Citrat-Grundmedium</b>	<b>Menge pro L</b>	<b>Endkonzentration</b>
Fe <sup>3+</sup> -Citrat	9,8 g	40,0 mM
auf pH 7,0 einstellen		
10 x Salze (Tab. 6)	100,0 ml	
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	0,213 g	1,0 mM
NaHCO <sub>3</sub>	1,8 g	21,0 mM
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,5 g	5,0 mM
Laktat (50%, w/w)	4,48 g	20,0 mM
NaAcetat	0,82 g	10,0 mM

---

NaPropionat	0,42 g	4,4 mM
Spurenelemente (Tab. 7)	10,0 ml	
Selenit-Wolframat (Tab. 8)	1,0 ml	

auf pH 7,0 einstellen

H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> ad 980,0 ml

---

### 3.1.1. Isolierung aus dem Abwasser der Emschergenossenschaft

Um in einer ersten Überprüfung feststellen zu können, ob überhaupt exoelektrogene Mikroorganismen in dem Abwasser zu finden sind, wurde zunächst 1 ml des Abwassers zu 9 ml des Fe<sup>3+</sup>-Citrat-Mediums, in ein steriles anaerobes Hungate, (siehe Tab. 5) gegeben und für 48 h bei 30 °C inkubiert. Hier wurde eine Temperatur von 30°C gewählt, da diese den Gegebenheiten des Klärwerks, bzw. der Entnahmestelle des Abwassers entspricht. Nach der Inkubation wurde der Ansatz, bzw. das Medium auf Farbumschlag und damit auf Fe<sup>3+</sup>-Reduktion untersucht. Für die eigentlichen Isolierungsversuche wurde eine Verdünnungsreihe (10<sup>-1</sup>-Verdünnung bis 10<sup>-8</sup>-Verdünnung) des Abwassers in Fe<sup>3+</sup>-Citrat-Medium, ebenfalls in sterilen anaeroben Hungates, hergestellt und davon je 200 µl auf Fe<sup>3+</sup>-Citrat-Agar (siehe Tab. 10) steril in einem Anaerobenzelt ausgestrichen. Für die Kultivierung der Agar-Platten wurden diese zunächst in einen Anaerobentopf gestellt und im Anschluss für 15 min mit 80% N<sub>2</sub> / 20% CO<sub>2</sub> begast, um die Gasphase in dem Topf zu tauschen. Im Anschluss wurden der Anaerobentopf mit der ausgestrichenen Verdünnungsreihe und auch die Hungates mit der hergestellten Verdünnungsreihe für 48 h bei 30°C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Platten auf Einzelkolonien untersucht, die erneut ausgestrichen werden konnten (Inkubation bei 30°C, 48 h). Es wurde ebenfalls überprüft, ob um die Kolonien ein Farbumschlag zu sehen war und damit Fe<sup>3+</sup>-Reduktion nachgewiesen werden konnte. Platten mit Bakterienrasen wurden verworfen. Die ausgestrichenen Einzelkolonien wurden immer wieder erneut auf Platte ausgestrichen und inkubiert, bis sichergestellt werden konnte, dass es sich um eine Reinkultur handelt. Dies wurde mittels PCR (siehe 3.11.1. PCR) und anschließender Sequenzierung (siehe 3.13.1. Sequenzierung nach Sanger) gezeigt und damit konnten die Mikroorganismen identifiziert und damit phylogenetisch eingeordnet werden (siehe 3.14.1. BLAST).

### 3.1.2. Isolierung aus dem Abwasser hinter dem Absetzzyklon (hA) und der Grobdosierung (GD) aus der Kläranlage der Firma Solvay

Auch die beiden Abwässer der Firma Solvay wurden identisch zu dem Vorgehen des Emscher-Abwassers untersucht. Zunächst einmal wurde überprüft, ob Exoelektrogene in dem Abwasser vorhanden waren, indem je 1 ml des Abwassers von hinter dem Absetzzyklon (hA) und der Grobdosierung (GD) zu je 9 ml Fe<sup>3+</sup>-Citrat-Medium, in ein steriles anaerobes Hungate, (siehe Tab. 5) gegeben wurde. Beide Ansätze wurden für 48 h bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden bei vorhandener Eisenreduktion (Farbumschlag von braun nach farblos) die eigentlichen Isolierungsversuche gestartet (siehe Emscher-Abwasser, 3.1.1 Isolierung aus dem Abwasser der Emschergenossenschaft). Es wurde lediglich die Inkubationstemperatur von 37°C gewählt, da diese näher an der Temperatur des Abwassers in der Anlage lag (hA = 40°C, GD = 42,9°). Auch hier wurden im Anschluss die vorhandenen Einzelkolonien erneut auf Fe<sup>3+</sup>-Citrat-Agar-Platten ausgestrichen und wie in 3.1.1. beschrieben bei 37°C inkubiert. Die weitere Vorgehensweise über die Reinkulturen bis hin zu der Sequenzierung ist dem Protokoll in 3.1.1. Isolierung aus dem Abwasser der Emschergenossenschaft zu entnehmen.

## 3.2. Wachstum der Isolate

### 3.2.1. Isolate der Emschergenossenschaft

Für das Wachstum der Isolate zur Herstellung der Cryokulturen der einzelnen Organismen, wurde für die Stämme *Bacteroides* sp. (Emscher, Em 1), *Clostridium* sp. (Em 2) und *Romboutsia* sp. (Em 5) 1% Glukose zu dem Fe<sup>3+</sup>-Citrat-Medium zugegeben (Tab. 12), um das Wachstum der Organismen zu gewährleisten. Bei 37°C konnten die Zellen anaerob in 10 ml Medium nach 24 h für *Clostridium* sp. und 48 h für *Bacteroides* sp. und *Romboutsia* sp. zur Herstellung von Kryokulturen vorbereitet werden (siehe 3.4.). *E. coli* (Em 3), *Enterococcus* sp. (Em 4) und *Shewanella* sp. (Em 6) wurden aerob über Nacht in 5 ml LB-Medium (Tab. 13), bei 37°, bzw. 30°C, inkubiert. Alle Organismen wurden im Anaerobenzelt von den Agar-Platten der Vereinzlungsausstriche mit einer sterilen Pipettenspitze in die Flüssigmedien überimpft.

### 3.2.2. *Clostridium* sp. I (So 1), *Clostridium* sp. II (So 2) und *Paenibacillus* sp. (So 4) (Isolate Solvay)

Für das anaerobe Wachstum der drei Isolate wurde das Fe<sup>3+</sup>-Citrat-Medium aus den Isolierungskampagnen leicht abgeändert: nach dem Autoklavieren wurde zusätzlich 1% Glukose zugegeben, um das Wachstum der Organismen zu gewährleisten (Tab 12). Die Herstellung des Mediums ist gleich, wie in 3.1. (Isolierungskampagnen und Kulturmedien von potentiell exoelektrogenen Mikroorganismen aus den verschiedenen Abwässern) beschrieben und auch die anaerobe Arbeitsweise kann diesem Kapitel entnommen werden.

*Tabelle 12: Zusammensetzung des Fe<sup>3+</sup>-Citrat-Mediums mit Glukose.*

<b>Fe<sup>3+</sup>-Citrat-Medium mit Glukose</b>	<b>Menge pro L</b>	<b>Endkonzentration</b>
Fe <sup>3+</sup> -Citrat	9,8 g	40,0 mM
auf pH 7,0 einstellen		
10 x Salze (Tab. 6)	100,0 ml	
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	0,213 g	1,0 mM
NaHCO <sub>3</sub>	1,8 g	21,0 mM
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,5 g	5,0 mM
Laktat (50%, w/w)	4,48 g	20,0 mM
NaAcetat	0,82 g	10,0 mM
NaPropionat	0,42 g	4,4 mM
Spurenelemente (Tab. 7)	10,0 ml	
Selenit-Wolframat (Tab. 8)	1,0 ml	
auf pH 7,0 einstellen		
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	ad 930,0 ml	
aufkochen, abkühlen, begasen, autoklavieren		
komplementieren:		
Vitaminlösung (Tab. 9)	10,0 ml	
Hefeextrakt (10%)	10,0 ml	0,1%
0,5 M Cystein	2,0 ml	1,0 mM
0,2 M NaAscorbat	1,0 ml	0,2 mM
0,4 M CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	1,0 ml	0,4 mM

---

Glucoselösung (40%)	25 ml	1%
---------------------	-------	----

---

auf pH 7,2 einstellen

---

Die 40%-ige Glucoselösung wurde ebenfalls, wie in 3.1. (Isolierungskampagnen und Kulturmedien von potentiell exoelektrogenen Mikroorganismen aus den verschiedenen Abwässern) beschrieben, hergestellt, anschließend steril filtriert (Filter mit 0,2  $\mu\text{m}$  Porengröße) und anaerobisiert. Nach Autoklavieren des Mediums konnte sie zusammen mit den anderen Lösungen komplementiert werden (siehe 3.1. Isolierungskampagnen und Kulturmedien von potentiell exoelektrogenen Mikroorganismen aus den verschiedenen Abwässern).

Für die erste Anreicherung nach den Isolierungskampagnen wurde Zellmaterial von den Agar-Platten, auf denen die Organismen isoliert wurden und in Reinkultur vorlagen, anaerob im Anaerobenzelt mit einer sterilen Spritze entnommen. Auf die Spritze wurde eine sterile Kanüle aufgesetzt und, in ein mit 10 ml  $\text{Fe}^{3+}$ -Citrat-Medium gefülltes Hungate, hineingestochen. Nun wurde solange Medium in die Spritze aufgezogen, bis sich das Zellmaterial von der Spritzenspitze gelöst hatte und im Medium resuspendiert war. Die Organismen wurden über Nacht (ÜN) bei 37°C inkubiert und konnten danach bei Bedarf in größere Volumina (50 bis 300 ml) überimpft werden. Auch diese wurden wieder ÜN bei 37°C inkubiert und konnte dann für die jeweiligen Versuche eingesetzt werden. Für weitere Anreicherungen dieser Organismen wurden 1 ml-Cryokulturen (siehe 2.4. Herstellung von Kryokulturen) aufgetaut und zu 9 ml des Kulturmediums in ein Hungate gegeben und wie beschrieben (ÜN, 37°C) inkubiert und bei Bedarf in größere Volumina überimpft.

### **3.2.3. *E. coli* (So 3 – Isolat Solvay)**

Das Wachstum von *E. coli* erfolgte für alle Versuche aerob in LB-Medium (siehe Tab. 13). Für die erste Anreicherung wurde mit einer sterilen Pipettenspitze (im Anaerobenzelt) Zellmaterial von der Agar-Platte mit der isolierten Kultur entnommen und in 5 ml LB Medium (Reagenzglas mit aerobem Medium) resuspendiert. Für die Anreicherung größerer Volumina konnte ausgehend von einer Flüssigkultur 1%-ig überimpft werden. Die Kultur wurde ÜN bei 37°C und 150 rpm schüttelnd kultiviert. Für weitere Anreicherungen wurde aus einer Kryokultur (siehe 3.4. Herstellung von Kryokulturen) Zellmaterial auf eine LB-Agarplatte (1,5 g/100 ml LB-medium) ausgestrichen und ebenfalls ÜN bei 37°C kultiviert. Ausgehend von dieser Platte konnten Einzelkolonien in 5 ml Flüssigmedium überführt und im Anschluss kultiviert werden. Alle 3 Wochen wurde *E. coli* auf eine neue Agar-Platte ausgestrichen.

Tabelle 13: Zusammensetzung des LB-Mediums (engl. lysogeny broth).

LB-Medium	Menge pro L
Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	ad 1L

### 3.3. Wachstum des Laborstammes *Geobacter sulfurreducens*

Für das Wachstum von *Geobacter sulfurreducens* wurde ein anaerobes Medium mit 15 mM Acetat als e<sup>-</sup>-Donor und 40 mM Fumarat als e<sup>-</sup>-Akzeptor hergestellt (siehe Tab. 14).

Tabelle 14: Zusammensetzung des *Geobacter*-Mediums.

<i>Geobacter</i> -Medium	Menge pro L	Endkonzentration
10 x Salze (Tab. 6)	100,0 ml	
NaHCO <sub>3</sub>	1,8 g	21,0 mM
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,5 g	5,0 mM
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	0,213 g	1,0 mM
Na <sub>2</sub> Fumarat	6,4 g	40,0 mM
NaAcetat	1,24 g	15,0 mM
Spurenelemente (Tab. 7)	10,0 ml	
Selenit-Wolframat (Tab. 8)	1,0 ml	
	auf pH 7,0 einstellen	
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	ad 970,0 ml	
	aufkochen, abkühlen, begasen, autoklavieren	
	komplementieren:	
Vitaminlösung (Tab. 9)	10,0 ml	
Hefeextrakt (10%)	10,0 ml	0,1%
Casiton (20%)	10,0 ml	0,2%
0,5 M Cystein	2,0 ml	1,0 mM

---

0,2 M NaAscorbat	1,0 ml	0,2 mM
0,4 M CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	1,0 ml	0,4 mM

auf pH 7,0 einstellen

---

Die Grundlage dieses Mediums basiert auf den Angaben von Dolch *et al.* (2014). Die anaerobe Arbeitsweise kann ebenfalls Kapitel 3.1. Isolierungskampagnen und Kulturmedien von potentiell exoelektrogenen Mikroorganismen aus den verschiedenen Abwässern entnommen werden. Für die Anreicherung wurde zunächst eine Cryokultur (1 ml; siehe 3.4 Herstellung von Kryokulturen) aufgetaut und zu 9 ml des *Geobacter*-Mediums in ein Hungate gegeben und für 48 h bei 30°C inkubiert. Die 48 h-Kultur konnte dann bei Bedarf in ein größeres Volumen (50 bis 300 ml) überimpft werden. Auch diese Kultur wurde wieder 48 h bei 30°C inkubiert und konnte dann für die jeweiligen Versuche eingesetzt werden.

### 3.4. Herstellung von Cryokulturen

Für die Cryokonservierung der Mikroorganismen wurden die Zellen einer ÜN-, bzw. 48 h-Kultur (10 ml) zunächst bei 6000 g und 4°C für 5 min zentrifugiert (Haraeus Multifuge X1R, Thermo Scientific) und in der gleichen Menge des jeweiligen Kulturmediums (siehe 3.2 Anreicherung der Isolate) wiederaufgenommen. Von dieser Kultur wurden im Anschluss 900 µl in ein 1,8 ml-Cryogefäß pipettiert und 100 µl steriles, bei Bedarf anaerobes Glycerin (Endkonzentration 10%) zugegeben. Die fertigen Kulturen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 3.5. Vorbereitung und Analyse des Abwassers (hinter Absetzzyklon)

Für alle, in dieser Arbeit mit Abwasser durchgeführten Versuche, wurde das Abwasser von hinter dem Absetzzyklon (hA) der Firma Solvay verwendet. Dieses wurde in großen Mengen von der Firma bezogen und bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Für die einzelnen Versuche wurde die benötigte Menge aufgetaut und über einen Flaschenaufsatzfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm (Sarstedt; Nümbrecht) steril filtriert. Zu Beginn dieser Arbeit wurde das Abwasser auf seine Zusammensetzung hin untersucht: die Acetatkonzentration, der TOC (total organic carbon) und TN (total nitrogen), die Phosphat-, Nitrat-, Nitrit- und Ammoniumkonzentration (siehe 3.12. Analytische Methoden) wurden ermittelt.

### 3.6. Versuche zur Fe<sup>3+</sup>-Reduktion der Isolate

In diesem Versuch sollte die Fähigkeit der isolierten Organismen, *Clostridium* sp. I, *Clostridium* sp. II, *Paenibacillus* sp. und *E. coli* (Solvay-Abwasser), zur Fe<sup>3+</sup>-Reduktion in einem sog. Ferrozine-Assay untersucht werden. Für die anaeroben Wachstumsversuche wurden ÜN-Kulturen der einzelnen Organismen in einem Volumen von 100 – 150 ml angesetzt (siehe 3.2.1. und 3.2.2. Anreicherung der Organismen). Am nächsten Tag wurden zunächst alle ÜN-Kulturen für 5 min bei 6000 g und 4°C abzentrifugiert (Haraeus Multifuge X1R, Thermo Scientific), 3 x in ca. 10 ml 1 x Salzen (1:10 Verdünnung von 10 x Salzen, siehe Tab. 6) gewaschen (6000 g, 5 min, 4°C; Haraeus Multifuge X1R, Thermo Scientific) und im Anschluss in dem jeweiligen Kulturmedium (ca. 20 ml) resuspendiert (*E. coli*: Fe<sup>3+</sup>-Citrat-Medium, siehe Tab. 5; *Clostridium* sp. I, *Clostridium* sp. II, *Paenibacillus* sp.: Fe<sup>3+</sup>-Citrat-Medium mit Glukose, siehe Tab. 12). Für die Wachstumsversuche wurden das Inokulationsvolumen für alle Organismen auf eine OD<sub>655</sub> = 0,05 (Genesys 20, Thermo Spectronic) in 100 ml des Fe<sup>3+</sup>-Citrat-Mediums für *E. coli* und 100 ml Fe<sup>3+</sup>-Citrat-Medium mit Glukose für *Clostridium* sp. I, *Clostridium* sp. II und *Paenibacillus* sp. eingestellt. Die Inkubation der Kulturen erfolgte bei 37°C über einen bestimmten Zeitraum, indem regelmäßig Proben (je 1 ml) entnommen wurden. Zum Zeitpunkt t<sub>0</sub>, d.h. direkt nach der Inokulation, wurde die erste Probe entnommen. Um die Reoxidation von Fe<sup>2+</sup> zu Fe<sup>3+</sup> in aerober Umgebung zu verhindern, wurden sofort nach der Entnahme 100 µl Probe mit 900 µl 1 M HCl verdünnt. Im Anschluss wurde zur Bestimmung der Fe<sup>3+</sup>-Reduktion der Ferrozine-Assay durchgeführt (siehe 3.12.5.). Die in HCl verdünnten Proben konnten bis zur Untersuchung bei -20°C aufbewahrt werden. Alle Versuche wurden im Triplikate durchgeführt.

### 3.7. Wachstumsversuche mit *Clostridium* sp. I

Für die genauere Untersuchung des Wachstumsverhaltens von *Clostridium* sp. I wurden zusätzliche Versuche durchgeführt. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Versuchsansätze miteinander verglichen:

- (1) anaerobe Respiration: Fe<sup>3+</sup>-Reduktion & Umsetzung der im Medium enthaltenen Glukose zu organischen Säuren
- (2) Gärung: Umsetzung der im Medium enthaltenen Glukose zu organischen Säuren

Für die beiden Ansätze wurde das Medium aus Tabelle 12 leicht abgeändert:

- (1) Fe<sup>3+</sup>-Citrat-Medium ohne die e<sup>-</sup>-Donoren Acetat, Laktat und Propionat
- (2) Medium ohne Fe<sup>3+</sup>-Citrat und die e<sup>-</sup>-Donoren Acetat, Laktat und Propionat

Wie in 2.6. (Wachstumsversuche der Isolate) beschrieben, wurde eine ÜN-Kultur von *Clostridium* sp. I angesetzt und am darauffolgenden Tag nach dem Waschen in einem Inokulationsvolumen von 100 ml des jeweiligen Mediums mit einer  $OD_{655} = 0,05$  für den anaeroben Respirations-Versuch und 100 ml mit einer  $OD_{600} = 0,05$  für den Gärungs-Versuch aufgenommen. Die Kulturen wurden bei 37°C kultiviert und über einen Zeitraum von 24 h wurden zu bestimmten Zeitpunkten je 2 ml Probe entnommen. Die erste Probe wurde direkt nach Versuchsstart zum Zeitpunkt  $t_0$  genommen. Nach Probenentnahme wurde je 1 ml für anschließende HPLC-Analysen (siehe 3.12.1.) verwendet und 1 ml zur Messung der  $OD_{655}$ , bzw.  $OD_{600}$ . Für den anaeroben Respirations-Versuch wurden zusätzlich 100 µl zur Bestimmung der  $Fe^{2+}$ -Konzentration mittels Ferrozine-Assay (siehe 3.6. und 3.12.5.) entnommen. Sowohl die Proben für die HPLC-Analyse, als auch die Proben (1:10 in 1 M HCl verdünnt) für den Ferrozine-Assay konnten bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert werden. Alle Versuche wurden im Triplikat durchgeführt.

Die Wachstumsrate  $\mu$  der Wachstumsversuche wurde nach Formel 1 und die Verdopplungszeit  $t_d$  nach Formel 2 berechnet. Die Wachstumsrate  $\mu$  errechnet sich aus den, zu den Zeiten  $t_0$  und  $t$  gemessenen optischen Dichten ( $OD_{600/655}$ )  $x_0$  und  $x_t$ . Die Verdopplungszeit  $t_d$  lässt sich dann mit dem aus  $\mu$  berechneten Wert errechnen.

$$\text{Wachstumsrate } \mu \text{ [min}^{-1}\text{]} = \frac{\ln(x_t) - \ln(x_0)}{t - t_0} \quad (1)$$

$$\text{Verdopplungszeit } t_d \text{ [min]} = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (2)$$

### **3.8. Wachstumsversuche mit *Geobacter sulfurreducens* unter verschiedenen Bedingungen**

Im Hinblick auf die Verwendung des Laborstammes *Geobacter sulfurreducens* zur Aufreinigung des Abwassers hinter dem Absetzzyklon der Firma Solvay, wurden verschiedene Versuche durchgeführt. Alle Versuche wurden im Triplikat durchgeführt. Die Wachstumsraten  $\mu$  der Wachstumsversuche und die Verdopplungszeit  $t_d$  wurden, wie in 3.7. (Wachstumsversuche mit *Clostridium* sp. I) beschrieben, errechnet.

### 3.8.1. Wachstum mit verschiedenen Abwasserkonzentrationen

Wie bereits erwähnt, wurde in einem ersten Versuch das Wachstumsverhalten von *Geobacter sulfurreducens* bei verschiedenen Abwasserkonzentrationen (100%, 75%, 50%, 25%, 0% hA, siehe Tab. 15) getestet. Um die maximal tolerierbare Abwasserkonzentration zu bestimmen, wurde das hA-Abwasser mit dem *Geobacter*-Medium (ohne Zugabe von Acetat als e<sup>-</sup>-Donor und Fumarat als e<sup>-</sup>-Akzeptor, siehe 2.3. Anreicherung des Laborstammes *Geobacter sulfurreducens* Barcode, Tab. 14) gemischt.

Tabelle 15: Zusammensetzung der Medien mit verschiedenen hA-Konzentrationen

<b>Geobacter-Medium ohne Acetat/Fumarat in %</b>	<b>hA in %</b>
0	100
25	75
50	50
75	25
100 ( <i>Geobacter</i> -Medium (Tab. 14))	0

Somit wurden 5 verschiedene Ansätze getestet:

- (1) 100% hA mit 21 mM NaAcetat und 40 mM Na<sub>2</sub>Fumarat
- (2) 75% hA mit 21 mM NaAcetat und 40 mM Na<sub>2</sub>Fumarat
- (3) 50% hA mit 21 mM NaAcetat und 40 mM Na<sub>2</sub>Fumarat
- (4) 25% hA mit 21 mM NaAcetat und 40 mM Na<sub>2</sub>Fumarat
- (5) *Geobacter*-Medium als Kontrolle

Die verschiedenen hA-Ansätze wurden wie folgt hergestellt:

Zunächst wurde die gewünschte Menge (100 ml, 75 ml, 50 ml, 25 ml) des steril filtrierte hA-Abwassers in eine 150 ml Schottflasche gegeben und mit einem Stopfen und Anaerobdeckel verschlossen. Das Abwasser wurde ca. 15 min mit 80% N<sub>2</sub> / 20% CO<sub>2</sub> begast und alle Ansätze wurden auf die gleiche Konzentration NaAcetat (21 mM) und Na<sub>2</sub>Fumarat (40 mM) eingestellt (ausgehend eines 100 ml-Ansatzes). Danach wurde die jeweilige Menge *Geobacter*-Medium ohne Acetat/Fumarat komplementiert (0 ml, 25 ml, 50 ml, 75 ml). Für das Komplementieren des e<sup>-</sup>-Donors und des e<sup>-</sup>-Akzeptors wurde von beiden Substraten eine 1 M Lösung hergestellt, steril filtrierte und anaerobisiert (siehe 3.1.). Am Ende wurde der pH-Wert mit steriler, anaerober 1 M NaOH auf 7,0

eingestellt. Für den Wachstumsversuch wurde, wie in 2.3. (Anreicherung des Laborstammes *Geobacter sulfurreducens* Barcode) beschrieben, eine 48 h-Kultur (ca. 300 ml) angesetzt. Diese wurde zunächst für 10 min bei 6000 rpm und 4°C abzentrifugiert (Avanti J-26 XP, Beckman Coulter), 3 x in ca. 10 ml hA-Abwasser gewaschen (6000 rpm, 10 min, 4°C; Haraeus Multifuge X1R, Thermo Scientific) und im Anschluss in dem jeweiligen Abwasser/Medium-Gemisch (ca. 20 ml) resuspendiert. Das Inokulationsvolumen wurde für alle Ansätze (100 ml) auf eine  $OD_{600} = 0,1$  (Genesys 20, Thermo Spectronic) eingestellt. Die Inkubation der Ansätze erfolgte bei 30°C. Über einen Zeitraum von maximal 7 Tagen wurden regelmäßig Proben entnommen und die  $OD_{600}$  bestimmt. Die erste Probe wurde direkt nach der Inokulation ( $t_0$ ) gemessen.

### 3.8.2. Adaptationsversuch in 75% hA

Nach der Ermittlung der maximal tolerierbaren Abwasserkonzentration, wurden mit dieser bestimmten Konzentration (75% hA) Adaptationsversuche des Laborstammes an das Abwasser durchgeführt. Es sollte untersucht werden, ob der Organismus in der Lage ist, über einen Zeitraum von fünf Wochen, seine Wachstumsrate in dem Abwasser zu steigern. Hierfür wurde ebenfalls, wie in 3.8.1. (Wachstum mit verschiedenen Abwasserkonzentrationen) beschrieben, ein 75%-iges Abwasser/Medium-Gemisch hergestellt und ausgehend von einer 48 h-Kultur von *Geobacter sulfurreducens* (Barcode) die Ansätze (100 ml) mit einer Start- $OD_{600} = 0,1$  beimpft. Für eine Adaptationsgeneration wurde über 7 Tage, 2-3 mal täglich, die  $OD_{600}$  gemessen und damit das Wachstum verfolgt. Die Inkubation erfolgte bei 30°C. Für das Überimpfen in die nächste Adaptationsgeneration wurde aus der aktuellen Generation der Ansatz mit dem schnellsten Wachstum gewählt und erneut in 75%-iges Abwasser/Medium-Gemisch mit einer Start- $OD_{600} = 0,1$  überführt und wieder über 7 Tage, 2-3 mal täglich, die  $OD_{600}$  gemessen. Dies wurde über 5 Wochen fortgeführt. Um eine genauere Aussage über die Adaptation des Stammes an das Abwasser treffen zu können, wurde ausgehend von der letzten Adaptationsgeneration eine Transkriptomanalyse durchgeführt. Dafür wurde der schnellste Ansatz der 5. Adaptationsgeneration bereits in seiner exponentiellen Phase weiter überimpft, sodass die 6. Adaptationsgeneration ebenfalls in der exponentiellen Phase mit einer  $OD_{600} = 0,15$  geerntet werden konnte. Die Zellen wurden hierfür für 10 min bei 6000 rpm und 4°C abzentrifugiert (Avanti J-26 XP, Beckman Coulter) und das Pellet in 6 ml 75%-iges Abwasser/Medium-Gemisch resuspendiert. Der Kultur wurde mit 18 ml LifeGuard™ Soil Preservation Solution vermischt und bis zur RNA-Isolierung bei -20°C aufbewahrt (siehe 3.11.6. RNA-Isolierung von Flüssigkulturen). Um diese 6. Adaptationsgeneration mit der Kultur der 1. Adaptationsgeneration vergleichen zu können, wurde die 1. Generation ebenfalls in der exponentiellen Phase mit einer

OD<sub>600</sub> = 0,15 geerntet und für die RNA-Isolierung gleich der 6. Generation verfahren.

### 3.8.3. Wachstum mit verschiedenen Phosphat- und Ammoniumkonzentrationen

Um eventuelle Störstoffe in dem Abwasser zu ermitteln, die eine negative Auswirkung auf das Wachstum von *Geobacter sulfurreducens* (Barcode) haben, wurden verschiedene Medien (synthetisches Abwasser) hergestellt, die eine erhöhte Phosphat- und /oder Ammoniumkonzentration (gleich den Konzentrationen im hA-Abwasser) aufwiesen. Für diese Wachstumsversuche wurde das *Geobacter*-Medium entsprechend verändert und in vier verschiedenen Ansätzen getestet:

- (1) synthetisches Abwasser mit 41 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- (2) synthetisches Abwasser mit 17,62 mM NH<sub>4</sub>Cl
- (3) synthetisches Abwasser mit 41 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 17,62 mM NH<sub>4</sub>Cl
- (4) *Geobacter*-Medium als Kontrolle

Die Konzentration von Phosphat und Ammonium im Abwasser wurden zuvor ermittelt (siehe 3.12.3. IC und 3.12.4. Hach-Lange Küvetten-Tests). Wie in den beiden Vorversuchen (3.8.1. und 3.8.2.) beschrieben, wurde auch hier ausgehend von einer 48 h-Kultur von *Geobacter sulfurreducens* (Barcode) die 150 ml-Ansätze mit einer Start-OD<sub>600</sub> = 0,03 beimpft und drei mal täglich, über einen Zeitraum von 4 Tagen, die OD<sub>600</sub> und damit das Wachstum bestimmt. Die Inkubation erfolgte bei 30°C.

## 3.9. M3C-Systeme mit hA-Abwasser

Für alle Versuche zur Untersuchung der Stromproduktion und des Substratabbaus im Abwasser wurden die bioelektrochemischen Systeme, wie in 1.6. BES-Reaktor beschrieben, verwendet. Nach dem Zusammenbauen wurden diese mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> in Anoden- und Kathodenkompartiment autoklaviert. Als Anodenmedium wurde für alle Versuche das steril-filtrierte hA-Abwasser (siehe 3.5. Vorbereitung und Analyse des Abwassers (hinter Absetzzyklon)) verwendet, welches in 270 ml-Portionen in 500 ml Schottflaschen gefüllt und vor Gebrauch mit 99% N<sub>2</sub> unter Schütteln steril anaerobisiert wurde (siehe 2.1. Isolierungskampagnen und Kulturmedien von potentiell exoelektrogenen Mikroorganismen aus den verschiedenen Abwässern). Das Abwasser (ohne und mit den Organismen) wurde, wie in 2.1. erwähnt, von den Schottflaschen mittels Gasdruck (N<sub>2</sub> / CO<sub>2</sub>,

80% / 20%) in die Reaktoren überführt, nachdem vorher unter der Sterilbank (HeraSafe, Hereaus; Hanau) das  $H_2O_{dd}$  über einen Beprobungsstutzen entfernt wurde. Als Kathodenmedium (siehe Tab.16) wurde ein Salzgemisch verwendet, welches in ähnlicher Zusammensetzung in den Kulturmedien eingesetzt wurde. Dieses wurde autoklaviert und vor Gebrauch mit einer Spritze über einen Schlauch mit Kanüle in das Kathodenkompartiment eingebracht. So wurde das im Kathodenkompartiment vorhandene  $H_2O_{dd}$  über eine zweite Kanüle mit Schlauch nach außen verdrängt. Es wurden ca. 20 ml Kathodenmedium eingespritzt, um die Flüssigkeit einmal auszutauschen.

*Tabelle 16: Zusammensetzung des Kathodenmediums.*

<b>Kathodenmedium</b>	<b>Menge pro L</b>	<b>Endkonzentration</b>
$KH_2PO_4$	0,42 g	3 mM
$K_2HPO_4$	0,22 g	1 mM
$NH_4Cl$	0,2 g	4 mM
KCl	0,38 g	5 mM
NaCl	2,93 g	50 mM
$MgCl_2 \cdot 6 H_2O$	0,213 g	1,0 mM
Spurenelemente (Tab. 7)	10,0 ml	
Selenit-Wolframat (Tab. 8)	1,0 ml	
	auf pH 7,0 einstellen	
$H_2O_{dd}$	ad 1000,0 ml	

Für die Messung der Stromproduktion wurde der Mehrkanalpotentiostat 6 EmStat3 (PalmSens BV, Randhoeve, Niederlande) verwendet. Über eine Ag/AgCl-Referenzelektrode (Sensortechnik Meinsberg, Ziegra-Knobelsdorf) wurde ein konstantes Potential von -199 mV ( $\sim 0$  mV vs. NHE) an der Anode angelegt. Anode, Kathode und Referenzelektrode wurden, wie in 1.6. (BES-Reaktor) beschrieben, kontaktiert und es erfolgte eine chronoamperometrische Messung des Stroms über die Zeit, bei der alle 300 s ein Messwert aufgezeichnet wurde (Software: Multi Trace, PalmSens BV, Randhoeve, Niederlande). Abbildung 9 zeigt das Verschaltungsschema der Elektroden mit dem Potentiostat.

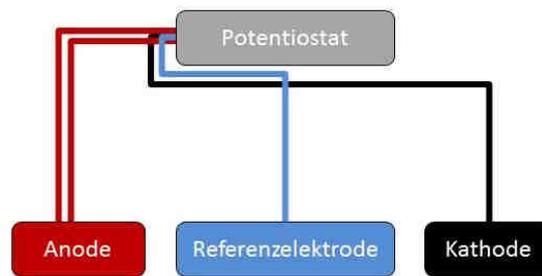


Abbildung 9: Verschaltungsschema der mikrobiellen Brennstoffzelle im 3-Elektroden-Messprinzip. Die Anode (Working Electrode und Working Sense), die Kathode (Counter Electrode) und die Referenzelektrode, als Bezugslektrode, sind an dem Potentiostat (Galvanostat) angeschlossen.

Während des Versuchszeitraumes wurden die Brennstoffzellen je nach Versuchsaufbau mit 99% N<sub>2</sub> oder N<sub>2</sub> / CO<sub>2</sub> (80% / 20%) über einen Sterilfilter (0,2 µm Porengröße) mit konstantem Gasstrom begast, um eine anaerobe Atmosphäre im Reaktor zu gewährleisten. Für eine kontinuierliche Durchmischung des Anodenmediums wurden die Reaktoren auf Magnetrührern (Topolino, IKA; Staufen) platziert. Die Reaktoren wurden für eine Temperaturkontrolle bei 30°C, bzw. 37°C in einem Inkubator (Incudrive H, Schuett-Biotech GmbH; Göttingen) betrieben. Während des Messzeitraumes wurden die Stromproduktion überwacht, regelmäßig der pH-Wert kontrolliert (FE20 FiveEasy™ Benchtop pH Meter, Mettler Toledo; Gießen) und die Veränderung der Acetat-Konzentration (siehe 3.12.1. HPLC) und des TOC-Wertes (siehe 3.12.2. TOC) gemessen. Der pH-Wert wurde regelmäßig mit 1 M NaOH (anaerob, steril) auf ca. 7,0 eingestellt.

Für die Auswertung erfolgte die Berechnung der mittleren Stromdichte (3) über den gesamten Messzeitraum und der Coulomb'schen Effizienz (CE) (4).

➤ Berechnung der mittleren Stromdichte:

$$\text{mittlere Stromdichte [mA/m}^2\text{]} = \frac{\int_0^t I(t) dt}{t} \quad (3)$$

Hierfür wurde zunächst die Stromdichte  $I$  [mA/m<sup>2</sup>] aus dem tatsächlich geflossenen Strom [mA] pro m<sup>2</sup> Anodenfläche berechnet. Die festgelegte Größe der Anode, bzw. die Oberfläche, die den Mikroorganismen als Besiedelungs- und Reaktionsfläche zur Verfügung steht, beträgt für den verwendeten Reaktor 36 cm<sup>2</sup>. Die mittlere Stromdichte über die komplette Laufzeit des Experiments wurde wie in Formel 3 errechnet.

- Berechnung der Coulomb'schen Effizienz (CE) (Rabaey *et al.*, 2005b):

Die Coulomb'sche Effizienz ist hier definiert als das Verhältnis (in Prozent) der Menge [mol] der Elektronen, die tatsächlich auf die Anode übertragen worden sind zu der maximal möglichen Menge an Elektronen [mol], die durch die Oxidation des TOC (Substrat in Form von TOC) entstanden sind.

$$n [C] = \frac{1}{EeN_A} * \int_0^t I(t) dt \quad (4)$$

Die Menge der Elektronen [mol], die auf die Anode übertragen werden (Menge Coulomb) erhält man, indem man den Strom über die Zeit integriert. Dies ist in Formel 4 dargestellt, wobei E die 4 Elektronen beschreibt, die pro mol Kohlenstoff in CO<sub>2</sub> übergehen, e die Elementarladung (1,6021766208 x 10<sup>-19</sup> C) und N<sub>A</sub> die Avogadro-Konstante (6,022140857 x 10<sup>23</sup> mol<sup>-1</sup>) ist.

$$n [TOC] = \frac{\Delta TOC}{1000 * M} * V_{An} \quad (5)$$

Die Berechnung der Menge an Elektronen [mol], die durch die Oxidation des TOC entstanden sind, zeigt die Gleichung 5. ΔTOC ist der verbrauchte TOC in g/L über die Zeit, M ist die molare Masse eines Kohlenstoffatoms (12 g/mol) und V<sub>An</sub> das Reaktorvolumen im Anodenkompartiment mit 270 ml. Für das Durchfluss-System besteht ΔTOC aus dem verbrauchten TOC im Reaktor und dem verbrauchten TOC aus dem Zufluss (ΔTOC = ΔTOC<sub>R</sub> + ΔTOC<sub>Z</sub>).

$$\text{Coulomb'sche Effizienz [\%]} = \frac{n[C]}{n[TOC]} * 100 \quad (6)$$

Die Berechnung der Coulomb'schen Effizienz [%] ist der Formel 6 zu entnehmen.

### 3.9.1. Vorbereitung der Kulturen

Für die Versuche wurden die jeweiligen Mikroorganismen, wie in 2.2. Anreicherung der Isolate und 2.3. Anreicherung des Laborstammes *Geobacter sulfurreducens* (Barcode) beschrieben, in 100 ml des jeweiligen Mediums vorkultiviert. Vor dem Einbringen in den Reaktor wurden die Kulturen zunächst für

5 min bei 6000 g und 4°C abzentrifugiert (Haraeus Multifuge X1R, Thermo Scientific), im Anschluss 3 x in ca. 10 ml anoxischem Waschmedium (siehe Tab. 17) gewaschen (6000 g, 10 min, 4°C; Haraeus Multifuge X1R, Thermo Scientific) und in hA-Abwasser (ca. 10 ml) resuspendiert. Das Inokulationsvolumen wurde für jeden Stamm auf eine  $OD_{600} = 0,02$ , bei einem Reaktorvolumen von 270 ml, eingestellt (Genesys 20, Thermo Spectronic) (Gesamt- $OD_{600} = 0,1$  bei 5 Stämmen und  $-OD_{600} = 0,08$  bei 4 Stämmen, siehe 3.9.2. und 3.9.3.). Wie bereits zuvor erwähnt, wurde das steril filtrierte hA-Abwasser in 270 ml-Portionen in Schottflaschen vorbereitet. Alle Organismen wurden zunächst mit der genannten  $OD_{600}$  in diese Flaschen eingebracht und mittels Gasdruck letztendlich in die BES-Reaktoren überführt.

*Tabelle 17: Zusammensetzung des Waschmediums.*

Waschmedium	Menge pro L	Endkonzentration
$KH_2PO_4$	0,42 g	3 mM
$K_2HPO_4$	0,22 g	1 mM
$NH_4Cl$	0,2 g	4 mM
KCl	0,38 g	5 mM
NaCl	0,36 g	6 mM
$MgCl_2 \cdot 6 H_2O$	0,213 g	1,0 mM
Spurenelemente (Tab. 7)	10,0 ml	
Selenit-Wolframat (Tab. 8)	1,0 ml	
	auf pH 7,0 einstellen	
$H_2O_{dd}$	ad 1000,0 ml	
	aufkochen, abkühlen, begasen, autoklavieren	
	komplementieren:	
0,2 M NaAscorbat	1,0 ml	0,2 mM

### 3.9.2. Batch-System

Die ersten Reaktoren in den bioelektrochemischen Versuchen wurden als Batch-Systeme betrieben (Abb. 10 zeigt den Aufbau des Systems). Dies bedeutet, dass die Organismen für eine Woche in dem steril filtrierte hA-Abwasser im Reaktor kultiviert wurden und während dieser Zeit, wie bereits beschrieben, die Stromproduktion, die Acetat-Konzentration, der TOC und der pH-Wert kontrolliert

wurden. Nach einer Woche wurde das hA-Abwasser durch neues Abwasser (ebenfalls steril filtriert) über eine Peristaltikpumpe (Pumpdrive 5001, Heidolph; Schwabach) ausgetauscht und der Versuch erneut für eine Woche gestartet. Nach dieser Woche wurde ein letztes Mal das Abwasser getauscht und wieder wurden die Organismen für eine Woche in dem Reaktor kultiviert. Die Versuche liefen somit über drei Wochen und wurden im Triplikat durchgeführt. Es wurden drei verschiedene Ansätze miteinander verglichen und eine Negativkontrolle durchgeführt:

- (1) Ansatz 1: Isolate (*Clostridium* sp. I, *Clostridium* sp. II, *Paenibacillus* sp., *E. coli*)
- (2) Ansatz 2: Isolate (*Clostridium* sp. I, *Clostridium* sp. II, *Paenibacillus* sp., *E. coli*) und der Laborstamm *G. sulfurreducens* (Barcode)
- (3) Ansatz 3: Laborstamm *G. sulfurreducens* (Barcode)
- (4) Negativkontrolle: hA-Abwasser NI (nicht inokuliert)

Ansatz 1, Ansatz 2 und die Negativkontrolle wurden bei 37°C und einer Begasung mit 99% N<sub>2</sub> durchgeführt. Für Ansatz 3 wurden die Bedingungen verändert. Zunächst wurde der Stamm mit einer OD<sub>600</sub> = 0,1 inokuliert, bei der Kultivierung in den Reaktoren die Begasung auf N<sub>2</sub> / CO<sub>2</sub> (80% / 20%) umgestellt und die Temperatur auf 30°C herabgesetzt. In diesen Versuchen wurde der pH-Wert ein bis zwei Mal pro Tag mit 1 M NaOH auf 7,0 eingestellt.

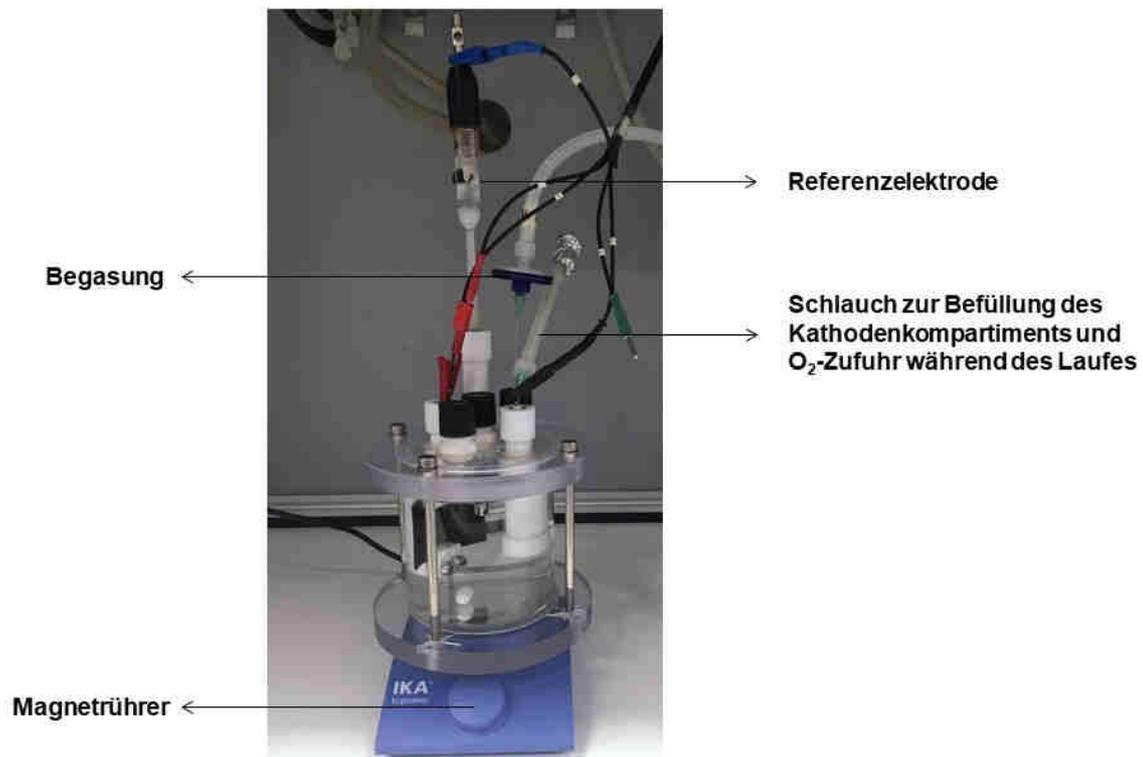


Abbildung 10: M3C-Reaktor (280 ml) im Batch-System. Das Bild zeigt den angeschlossenen Reaktor während der Messung mit Potentialkontrolle durch die Referenzelektrode, Begasung und kontinuierlichem Rühren.

### 3.9.3. Durchfluss-System

Nach der Untersuchung der BES-Reaktoren im Batch-System, wurde auf ein Durchfluss-System umgestellt. Dies bedeutet, dass an die Reaktoren eine Pumpe angeschlossen wurde und kontinuierlich frisches hA-Abwasser (steril, anaerob) in den Reaktor eingebracht wurde. Zudem wurde kontinuierlich die gleiche Menge an Abwasser über einen Abfluss aus dem System gepumpt (Abb. 11 zeigt den Aufbau des Systems). Der Versuch wurde über vier Monate hinweg beobachtet. Es wurden wieder zwei Ansätze miteinander verglichen:

- (1) Ansatz 1: Isolate (*Clostridium* sp. I, *Clostridium* sp. II, *Paenibacillus* sp., *E. coli*)
- (2) Ansatz 2: Isolate (*Clostridium* sp. I, *Clostridium* sp. II, *Paenibacillus* sp., *E. coli*) und der Laborstamm *G. sulfurreducens* (Barcode)

In diesem Langzeitexperiment wurde jedoch nicht direkt hA-Abwasser durch das System gepumpt, sondern zunächst über ein Medium eine Adaption der Organismen an die Anode gewährleistet. Hierfür wurden die Organismen der Vorkulturen nicht, wie in 3.9.1.Vorbereitung der Kulturen beschrieben, nach dem

Waschen in hA-Abwasser aufgenommen, sondern in 270 ml des Anodenmediums-AD (AD = Adaptation Durchfluss, siehe Tab. 18).

*Tabelle 18: Zusammensetzung des Anodenmediums-AD (Adaptation Durchfluss).*

<b>Anodenmedium-AD</b>	<b>Menge pro L</b>	<b>Endkonzentration</b>
10 x Salze (Tab. 6)	100,0 ml	
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	0,213 g	1,0 mM
NaHCO <sub>3</sub>	1,8 g	21,0 mM
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,5 g	5,0 mM
Laktat (50%, w/w)	4,48 g	20,0 mM
NaAcetat	0,82 g	10,0 mM
NaPropionat	0,42 g	4,4 mM
Spurenelemente (Tab. 7)	10,0 ml	
Selenit-Wolframat (Tab. 8)	1,0 ml	
auf pH 7,0 einstellen		
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	ad 980,0 ml	
aufkochen, abkühlen, begasen, autoklavieren		
komplementieren:		
Vitaminlösung (Tab. 9)	10,0 ml	
Hefeextrakt (10%)	10,0 ml	0,1%
0,5 M Cystein	2,0 ml	1,0 mM
0,2 M NaAscorbat	1,0 ml	0,2 mM
0,4 M CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	1,0 ml	0,4 mM
auf pH 7,2 einstellen		

Pro Stamm wurde wieder mit einer OD<sub>600</sub> = 0,02 (Genesys 20, Thermo Spectronic) in 270 ml des Anodenmediums-AD inokuliert.

Die Adaptationsphase der Organismen wurde über neun Tage bei 30°C verfolgt. Nach dieser Zeit wurde ein Pumpsystem angeschlossen. Mit einer geringen Anfangs-Flussrate von 0,015 ml/min und einer daraus errechneten HRT (engl.: hydraulic retention time, Hydraulische Verweilzeit des Mediums/Abwassers im

Reaktor) von ca. 12,5 Tagen, wurde das Anodenmedium-AD nach und nach durch das hA-Abwasser ausgetauscht. Auch diese langsame Flussrate diente der besseren Adaptation der Organismen an das System und das Abwasser. Nach 21,5 Tagen und damit dem vollkommenen Austausch des Mediums mit dem Abwasser, wurde der Einfluss der Flussrate auf die Stromproduktion, den TOC-Verbrauch sowie die Oxidation von Acetat untersucht. Die Flussrate wurde schrittweise um 25% bis Tag 37 erhöht: 0,015 ml/min (HRT = 12,5 Tage) → 0,01875 ml/min (HRT = 10 Tage) → 0,0234 ml/min (HRT = 8 Tage) → 0,0293 ml/min (HRT = 6,4 Tage). Nach zwei Tagen mit der höchsten Flussrate, wurde diese wieder schrittweise um 25% gesenkt, bis die anfangs-Flussrate von 0,015 ml/min an Tag 49 erreicht wurde. Zudem wurde der Einfluss der Temperatur auf das System untersucht: Es wurde auch hier schrittweise eine Temperaturerhöhung von 2°C durchgeführt. Ausgehend von 30°C wurde erstmalig an Tag 73 die Temperatur auf 32°C erhöht. Nach vier Tagen dann auf 34 °C und nach drei Tagen auf 37 °C. Die Reaktoren wurden während des Messzeitraumes kontinuierlich mit N<sub>2</sub> / CO<sub>2</sub> (80% / 20%) begast und regelmäßig die Stromproduktion, die Acetat-Konzentration, der TOC und der pH-Wert kontrolliert. Der pH-Wert wurde alle zwei Tage mit 1M NaOH auf 7,0 eingestellt. Für das Durchpumpen des Abwassers durch das System wurden eine 4-Kanal-Peristaltikpumpe (IPC, Ismatec; Wertheim) und Schläuche mit einem Innendurchmesser von 0,51 mm verwendet (Tygon® LMT-55 2-Stopperschläuche, Erweiterungsschläuche, Cole-Parmer; Wertheim und Schlauchverbinder IØ = 0,58 mm, AØ = 0,90 mm, L = 25mm, LHG; Karlsruhe).



Abbildung 11: M3C-Reaktor (280 ml) im Durchfluss-System. Das Bild zeigt den angeschlossenen Reaktor während der Messung mit Potentialkontrolle durch die Referenzelektrode, Begasung und kontinuierlichem Rühren. Zusätzlich wird hier über eine Peristaltikpumpe kontinuierlich frisches hA-Abwasser zugepumpt (Abwasser-Zufluss) und ebenso wieder aus dem Reaktor abgeführt (Abfluss der MFC).

Nach 92 Tagen wurde lediglich der Reaktor mit Ansatz 2 weiter betrieben. Dazu wurde zunächst einmal das bestehende Kathodenkompartiment unter der Sterilbank aus dem Reaktor ausgebaut und ein neues eingebaut, da an der darin eingebrachten Membran Ablagerungen vorhanden waren. Der Reaktor wurde wieder mit dem Potentiostaten verbunden und die Stromdaten konnten weiter aufgezeichnet werden. Nach weiteren zehn Tagen wurde eine automatisierte pH-Kontrolle in Form eines pH-Transmitters (si628 P wall mount transmitter, Hach-Lange; Düsseldorf) und einer pH-Sonde (pH-Elektrode 5330, Gel, PTFE, Hach-Lange; Düsseldorf) eingebaut, um den pH-Wert kontrollieren und auf einem konstanten Wert halten zu können. Der Transmitter wurde so programmiert, dass er bei Erreichen eines unteren Schwellenwertes von pH 7,0 die Zugabe von 1 M NaOH startet und diese bei einem Wert von pH 7,6 wieder stoppt. Bei Erreichen eines oberen Schwellenwertes von pH 8,0 wurde eine Pumpe mit 1 M HCl angesteuert, die wiederum bei pH 7,6 die Zufuhr von HCl stoppte. So konnte der pH-Wert in dem System konstant gehalten werden. Auch hier wurde während des Experiments regelmäßig die Stromproduktion überwacht, die Acetat-Konzentration und der TOC kontrolliert (Abb. 12 zeigt den Aufbau des Systems). Nach weiteren 45 Tagen wurde dieser Reaktor ebenfalls abgebaut und die Anode für weitere Analysen entnommen (siehe 3.9.4. Behandlung der Anode für weiterführende Analysen).

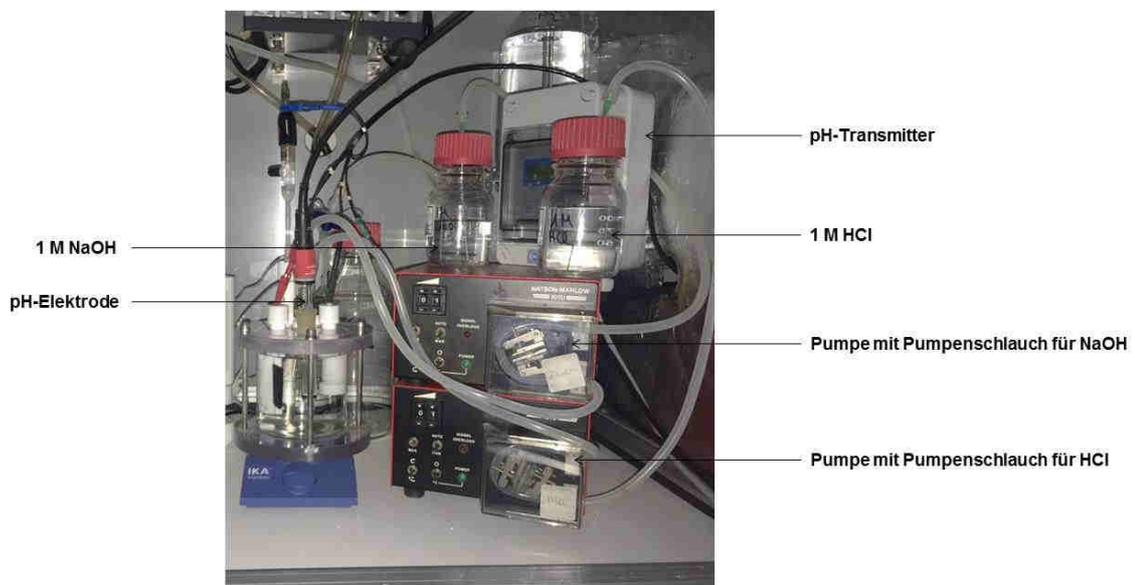


Abbildung 12: M3C-Reaktor (280 ml) im Durchfluss-System mit pH-Kontrolle. Das Bild zeigt den angeschlossenen Reaktor während der Messung. Zusätzlich zur Potentialkontrolle, etc. und dem kontinuierlichen Zu Pumpen von frischem Abwasser, wurde hier ein Transmitter zur Kontrolle des pH-Wertes angeschlossen. Über die zusätzlich an den Transmitter angeschlossenen Pumpen konnte das System mittels 1 M NaOH und 1 M HCl auf einem konstanten pH von ca. 7,2 gehalten werden.

### 3.9.4. Behandlung der Anode für weiterführende Analysen

Nach den Batch- und Durchfluss-Versuchen wurden die Anoden unter der Sterilbank (HeraSafe, Hereaus; Hanau) aus den Reaktoren entnommen. Mit einem sterilen Skalpell wurden diese dann für weitere Analysen zerkleinert und vorbereitet (Abb. 13 zeigt das Schnittmuster der Anode). Die Hälfte der Anode (3,5 x 3 cm) wurde in 5 ml LifeGuard™ Soil Preservation Solution in einem Nuklease-freiem 15 ml-Gefäß aufgenommen und wie in 3.11.6. RNA-Isolierung (RNA-Isolierung von der Anode) beschrieben, direkt die RNA isoliert. Aus der anderen Hälfte wurde ein 1 cm<sup>2</sup> großes Stück rausgeschnitten und für die FISH-Färbung verwendet. Dafür wurde die Anode sofort in die Fixierlösung gegeben (siehe 3.11.11 FISH – Fixierung von Biofilmen auf Anoden). Für die Bestimmung der Zellzahl mittels qPCR (siehe 3.11.10.) von *Geobacter sulfurreducens* (Barcode) auf den Anoden und der Metataxonomanalyse (siehe 3.13.3. Illumina-Sequenzierung für Metataxonomanalyse) zur Analyse der finalen Zusammensetzung der Organismen auf den Anoden wurde der Rest der Anode bis zur Isolierung der DNA (3.11.5. DNA-Isolierung - DNA-Isolierung von der Anode) bei -20°C eingefroren.

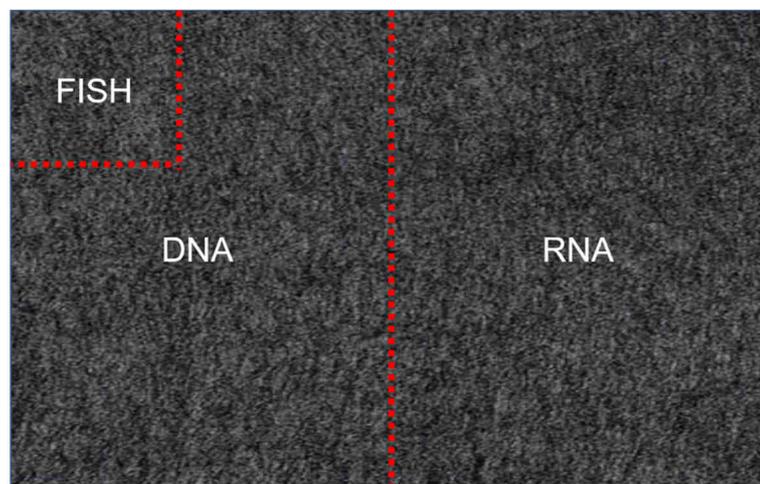


Abbildung 13: Schnittmuster der Anode. Nach den Brennstoffzellenläufen wurde die Anode für weitere Analysen, wie abgebildet, zugeschnitten: Für die RNA-Isolierung wurde die Hälfte der Anode (3,5 x 3 cm) verwendet, für die FISH-Färbung wurde aus der anderen Hälfte ein 1 x 1 cm großes Stück ausgeschnitten und der Rest wurde für die DNA-Isolierung verwendet. Die roten Linien zeigen das Schnittmuster.

Weiterführende Analysen für die verschiedenen Ansätze:

- (1) RNA-Isolierung: Ansatz 2 mit den Isolaten (*Clostridium* sp. I, *Clostridium* sp. II, *Paenibacillus* sp., *E. coli*) und des Laborstammes *G. sulfurreducens* (Barcode) des Batch- und Durchfluss-Systems

- (2) DNA-Isolierung: Ansatz 2 mit den Isolaten (*Clostridium* sp. I, *Clostridium* sp. II, *Paenibacillus* sp., *E. coli*) und des Laborstammes *G. sulfurreducens* (Barcode) des Batch- und Durchfluss-Systems
- (3) FISH: Ansatz 1 mit den Isolaten (*Clostridium* sp. I, *Clostridium* sp. II, *Paenibacillus* sp., *E. coli*), Ansatz 2 mit den Isolaten (*Clostridium* sp. I, *Clostridium* sp. II, *Paenibacillus* sp., *E. coli*) und des Laborstammes *G. sulfurreducens* (Barcode), Ansatz 3 mit dem Laborstamm *G. sulfurreducens* (Barcode) der Batch-Systeme und Ansatz 2 mit den Isolaten (*Clostridium* sp. I, *Clostridium* sp. II, *Paenibacillus* sp., *E. coli*) und des Laborstammes *G. sulfurreducens* (Barcode) des Durchfluss-Systems

### 3.10. M3C-System mit definiertem Medium

In diesem Versuch wurde die Fähigkeit von *Clostridium* sp. zur Anoden-Respiration untersucht. Als Anodenmedium wurde eine leicht abgeänderte Form des Fe<sup>3+</sup>-Citrat-Glukosemediums (siehe Tab. 19) ohne Fe<sup>3+</sup>-Citrat und die e<sup>-</sup>-Donoren Acetat, Laktat und Propionat eingesetzt. Als Kathodenmedium wurde das in Tabelle 16 beschriebene Medium verwendet. Die Vorbereitung des Reaktors entsprach der, der in 2.8. Bioelektrochemische Systeme (BES) mit hA-Abwasser beschriebenen Methode. Für den Versuch wurde eine ÜN-Kultur von *Clostridium* sp. I angesetzt und am darauffolgenden Tag ebenfalls in einem Inokulationsvolumen von 270 ml des Anodenmediums-C (C = Clostridium) mit einer OD<sub>600</sub> = 0,1 aufgenommen. Über Gasdruck wurde die Kultur in das Anodenkompartiment der Brennstoffzelle überführt.

Tabelle 19: Zusammensetzung des Anodenmediums-C (*Clostridium*).

Anodenmedium-C	Menge pro L	Endkonzentration
10 x Salze (Tab. 6)	100,0 ml	
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	0,213 g	1,0 mM
NaHCO <sub>3</sub>	1,8 g	21,0 mM
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,5 g	5,0 mM
Spurenelemente (Tab. 7)	10,0 ml	
Selenit-Wolframat (Tab. 8)	1,0 ml	
	auf pH 7,0 einstellen	
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	ad 950,0 ml	

aufkochen, abkühlen, begasen, autoklavieren

	komplementieren:	
Vitaminlösung (Tab. 9)	10,0 ml	
Hefeextrakt (10%)	10,0 ml	0,1%
0,5 M Cystein	2,0 ml	1,0 mM
0,2 M NaAscorbat	1,0 ml	0,2 mM
0,4 M CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	1,0 ml	0,4 mM
Glucoselösung (40%)	25 ml	1%

auf pH 7,2 einstellen

Für die Messung der Stromproduktion wurde ebenfalls der Mehrkanalpotentiostat 6 EmStat3 (PalmSens BV, Randhoeve, Niederlande) verwendet. Es wurde wieder ein konstantes Potential von -199 mV vs. Ag/AgCl (~ 0 mV vs. NHE) an der Anode angelegt (Ag/AgCl-Referenzelektrode, Sensortechnik Meinsberg, Ziegra-Knobelsdorf) und eine chronoamperometrische Messung durchgeführt (siehe 2.8. Bioelektrochemische Systeme (BES) mit hA-Abwasser). Während des Versuchszeitraumes wurden die Reaktoren mit N<sub>2</sub> / CO<sub>2</sub> (80% / 20%) über einen Sterilfilter der Porengröße 0,2 µm begast und bei einer Temperatur von 37°C inkubiert (Inkubator Incudrive H, Schuett-Biotech GmbH; Göttingen). Für eine kontinuierliche Durchmischung des Anodenmediums wurden die Reaktoren auf Magnetrührern (Topolino, IKA; Staufen) platziert. Während des Messzeitraumes wurde die Stromproduktion aufgezeichnet (Multi Win Software, PalmSens BV, Randhoeve, Niederlande) und regelmäßig der pH-Wert kontrolliert (FE20 FiveEasy™ Benchtop pH Meter, Mettler Toledo; Gießen) und die Veränderung der Glukose-Konzentration (siehe 3.12.1. HPLC) und die daraus entstehenden organischen Säuren bestimmt und gemessen. Der Versuch wurde im Triplikat durchgeführt, wobei einer der Ansätze mit der automatisierten pH-Kontrolle (siehe 3.9.3. Durchfluss-System) ausgestattet wurde, um den pH-Wert konstant auf ca. 7,0 zu halten. Der pH-Wert der beiden anderen Ansätze wurde während des Messzeitraumes regelmäßig mit 1 M NaOH (anaerob, steril) auf ca. 7,0 eingestellt.

## 3.11. Molekularbiologische Methoden

### 3.11.1. PCR (Polymerase Chain Reaction)

Die Polymerasekettenreaktion dient der Amplifikation von DNA-Fragmenten. In dieser Arbeit wurde die 16S rDNA amplifiziert, um die isolierten Organismen anhand dieser spezifischen DNA identifizieren zu können. Für eine erste grobe

phylogenetische Einordnung der isolierten Organismen aus den Abwässern (siehe 3.1.1 und 3.1.2) oder aber auch einer Kontroll-PCR wurde der Mango Mix und das Primer-Paar 1 27F und Universal1492R oder das degenerierte Primer-Paar 2 27F und 1525R (siehe Tab. 3) verwendet. Zur Vorbereitung der Kulturen für die PCR wurden die Einzelkolonien der Agar-Platten in 5 bis 10 ml  $\text{Fe}^{3+}$ -Citrat-Medium inokuliert und für 12 – 48 h, je nach Wachstumsrate, bei 30°C inkubiert. War wieder ein Farbumschlag des Mediums ( $\text{Fe}^{3+}$ -Reduktion) zu sehen und ein damit einhergehendes Zellwachstum, wurde 1 ml der Flüssigkultur entnommen und bei 16.000 g für 5 min zentrifugiert (Centrifuge 5418, Eppendorf). Das Pellet wurde im Anschluss in 1 ml 0,9% NaCl aufgenommen und für 5 min bei 95°C aufgekocht (Thermomixer Compact, Eppendorf), sodass die Zellen aufbrechen und die DNA frei wird, um als Template in der PCR eingesetzt zu werden. Für die Überprüfung des Laborstammes *G. sulfurreducens* (Barcode) wurde das Primer-Paar 5 (*G.s.* Genom for und *G.s.* Genom rev) verwendet. Für die Test-PCR vor der Sequenzierung für die Metataxonomanalyse (siehe 3.13.3. Illumina-Sequenzierung für Metataxonomanalyse) wurde das Primer-Paar 3 341F und 805R verwendet. Der MangoMix ist 2 x konzentriert und enthält bereits alle notwendigen Komponenten für eine PCR (mit Ausnahme der Primer) wie die Mango *Taq*<sup>TM</sup>-Polymerase, die dNTP's, rote und orange Farbstoffe (wichtig für die spätere Elektrophorese – siehe 3.11.2) und  $\text{Mg}^{2+}$  (dient als Stabilisator während der PCR) (siehe Reaktionsansatz für 25  $\mu\text{l}$ )

#### Reaktionsansatz für Mango Mix:

- 12,5  $\mu\text{l}$  2 x Mango Mix
  - 7,25  $\mu\text{l}$  Primer Forward (2 pmol/ $\mu\text{l}$ )
  - 7,25  $\mu\text{l}$  Primer Reverse (2 pmol/ $\mu\text{l}$ )
  - 1  $\mu\text{l}$  DMSO
  - 1  $\mu\text{l}$  DNA/Bakterienkultur (flüssig)  
oder eine Pippettenspitze Kultur von Platte
- } 25  $\mu\text{l}$  - Ansatz

#### PCR-Protokoll für Mango Mix:

- 5 min - 95°C Denaturierung
  - 30 s - 95°C Denaturierung
  - 30 s - 55°C Primer-Bindung
  - 1 min - 72°C Polymerase-Aktivität (2kb/min)
  - 10 min - 72°C Polymerase-Aktivität
- } 35 Zyklen

Für mehr Genauigkeit der Amplifikation der 16S rDNA wurde die iProof Polymerase verwendet. Diese Polymerase ist eine High-Fidelity Polymerase, welche in der Lage ist auch größere DNA-Abschnitte mit hoher Genauigkeit und Schnelligkeit zu amplifizieren und dabei die Fehlerrate geringer ist, als bei der im Mango Mix eingesetzten MangoTaq™-Polymerase. Bei der iProof müssen jedoch alle Komponenten extra hinzugefügt werden (siehe Reaktionsansatz für 30 µl).

#### Reaktionsansatz für iProof:

- 1 µl iProof Polymerase
  - 6 µl 5 x iProof GC Puffer
  - 7,25 µl Primer Forward (2 pmol/µl)
  - 7,25 µl Primer Reverse (2 pmol/µl)
  - 1 µl dNTP's
  - 1 µl DMSO
  - 5 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>
  - 1 µl DNA/Bakterienkultur (flüssig)  
oder eine Pippettenspitze Kultur von Platte
- } 30 µl - Ansatz

#### PCR-Protokoll für iProof:

- 5 min - 98°C Denaturierung
  - 30 s - 98°C Denaturierung
  - 30 s - 55°C Primer-Bindung
  - 1 min - 72°C Polymerase-Aktivität (2kb/min)
  - 10 min - 72°C Polymerase-Aktivität
- } 35 Zyklen

### **3.11.2. Agarose-Gelelektrophorese**

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode, die die Auftrennung von Nukleinsäuren (RNA oder DNA) in einem elektrischen Feld anhand ihrer Größe ermöglicht und somit den Nachweis über das Vorhandensein dieser ermöglicht. Die Geschwindigkeit, mit der die Nukleinsäuren durch das Gel wandern, hängt unter anderem von der Größe der DNA, bzw. RNA oder aber auch der Porengröße des Gels ab. In dieser Arbeit wurden 1%-ige Agarose-Gele verwendet. Für die Herstellung wurden 0,6 g Agarose in 60 ml 1 x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA, siehe Tab. 20) aufgekocht und für das spätere Sichtbarmachen mit 6 µl MidoriGreen (0,1 µl/ml) versetzt. Zum Aushärten wurde dies in ein Gelschlitten gegossen, mit dem gewünschten Kamm versehen und luftblasenfrei polymerisieren lassen. Nach dem Polymerisieren konnte der Kamm

aus dem Gel entfernt werden und dieses konnte in die Gelkammer (welche mit 1 x TAE-Puffer gefüllt war) eingebracht werden. Die Proben der PCR (siehe 3.11.1.) konnten nun auf das Gel aufgetragen werden. Falls nötig, wurden die Proben vorher mit Ladepuffer (6 x DNA Loading Dye Solution) versetzt (1 x Endkonzentration). Bei der Verwendung des Mango Mix in der PCR, war der Ladepuffer nicht notwendig. Zur Einschätzung der Größe der aufgetragenen Nukleinsäuren, wurde zusätzlich, abhängig von der Größe des zu erwartenden Fragments, ein Größenmarker (1 kb Ladder oder 50 bp Ladder) aufgetragen. Zum Auftrennen der Nukleinsäuren in der Gelkammer (PerfectBlue™ gelsystem, Peqlab) wurde eine Spannung von 120 V (Electrophoresis Power Supplies, Power Pac HC, Biorad) angelegt. Nachdem Auftrennen konnten die Nukleinsäuren über einen LED Transilluminator (FastGene Blue/Green LED Transilluminator, Nippon Genetics) sichtbar gemacht werden.

*Tabelle 20: Zusammensetzung des 1 x TAE-Puffers.*

<b>1 x TAE-Puffer</b>	<b>Menge pro L</b>	<b>Endkonzentration</b>
Tris	4,48 g	37 mM
Eisessig	1,14 g	0,114%
EDTA (0,5 M)	2 ml	1 mM
	auf pH 8,0 einstellen	
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	ad 1L	

### **3.11.3. Aufreinigung der PCR-Produkte (DNA)**

Hat die PCR funktioniert, d.h. waren Banden der 16S rDNA auf dem Gel sichtbar, konnte die DNA über das Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) aufgereinigt werden, um überschüssige Nukleotide, Primer, Enzyme oder auch Salze zu entfernen. Die Aufreinigung der DNA wurde immer aus dem Rest des PCR-Ansatzes (20 µl) durchgeführt und nach Herstellerangaben verfahren (Protokoll Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega). Um eine höhere DNA-Konzentration zu erhalten, wurde der letzte Schritt (Elution der DNA von der Säule) wiederholt. Die aufgereinigte DNA konnte nun für die Sequenzierung vorbereitet werden (siehe 3.13.1. Sequenzierung nach Sanger). Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bei -20°C.

### **3.11.4. Bestimmung der Konzentration von genomischer DNA**

Die Konzentration der isolierten DNA, bzw. der aufgereinigten PCR-Produkte wurde im Photometer (Spectrophotometer Nanodrop 2000, Thermo Scientific) bei

einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Der Quotient aus 260 nm/280 nm gibt hierbei Aufschluss über die Reinheit der DNA. Lag er bei 1,8, konnte von reiner DNA ausgegangen werden. Eine andere Möglichkeit zur Messung der DNA-Konzentration war die Verwendung des Qubit® dsDNA High-Sensitivity Kits (siehe 3.12.7.)

### 3.11.5. DNA-Isolierung

#### DNA-ISOLIERUNG VON FLÜSSIGKULTUREN

Für die Herstellung einer Standard-DNA-Eichreihe für die qPCR (siehe 3.11.10.) wurden ca. 150 ml einer 48h-Kultur von *G. sulfurreducens* (barcode) bei 6000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert (Beckman Coulter Avanti J-26 XP). Das Pellet wurde in 10 ml *Geobacter*-Medium resuspendiert und die OD<sub>600</sub> bestimmt. Daraus wurde eine Kultur mit OD<sub>600</sub> = 2 und eine Kultur mit OD<sub>600</sub> = 5 angesetzt. Aus diesen Ausgangskulturen wurden Verdünnungsreihen (1:10, 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000) im Triplikat hergestellt und bis zur DNA-Isolierung mindestens ÜN bei -20°C gelagert. Für die DNA-Isolierung wurden zu jedem Verdünnungsansatz 300 mg sterile Glass Beads (0,1 – 0,25 mm, Glastainless Steel; Retsch) und 1 ml Lysis Solution (SLS) (InnuPREP Stool DNA Kit; Analytik Jena) gegeben. Die Zellen jedes Verdünnungsansatzes wurden im Anschluss für 7 min bei 30 Hz mit Hilfe der Zelmühle (MM400, Retsch) mechanisch aufgeschlossen und für 15 min bei 95°C im Thermomixer (Thermomixer Compact, Eppendorf) erhitzt (dieser Schritt soll die Menge an extrahierter DNA zusätzlich erhöhen). Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml-Reagiergefäß überführt und für 2 min bei 8.000 g zentrifugiert (Centrifuge 5418, Eppendorf). 650 µl des Überstandes jeder Probe wurde laut Herstellerangaben in den Pre-Filter überführt und nach Protokoll verfahren (InnuPREP Stool DNA Kit; Analytik Jena). Am Ende des Protokolls wurde in 100 µl Elutionspuffer eluiert und die DNA der Standard-Eichreihe bei 4°C gelagert.

#### DNA-ISOLIERUNG VON DER ANODE

Nach der Entnahme des Anodenstücks (siehe 3.9.4. Behandlung der Anode für weiterführende Analysen) aus der Brennstoffzelle, wurde die Anode in einem sterilen Redcap, bis zur DNA-Isolierung für die Quantifizierung dieser (siehe 3.11.10. qPCR), bei -20°C gelagert. Am Tag der Isolierung wurde die Anode mit einem sterilen Skalpell zerkleinert. Zu der zerkleinerten Anode wurden nun 1,5 g sterile Glass Beads (siehe DNA-Isolierung von Flüssigkulturen) und 5 ml Lysis Solution (SLS) (InnuPREP Stool DNA Kit; Analytik Jena) gegeben und die Zellen auf den Fasern der Anode in der Zelmühle (MM400, Retsch) ebenfalls für 7 min bei 30 Hz mechanisch aufgeschlossen. Im Anschluss wurde der Ansatz 15 min bei 95°C im Wasserbad erhitzt und 2 x 1 ml der Proben in ein neues 1,5 ml-

Reagiergefäß überführt. Um restliches Anodenmaterial und Zellmaterial zu entfernen, wurde bei 8.000 g für 2 min zentrifugiert (Centrifuge 5418, Eppendorf). Auch hier wurde, wie bereits beschrieben (DNA-Isolierung von Flüssigkulturen), 650 µl des Überstandes in den Vorfilter (Pre-Filter, im Kit vorhanden) gegeben und im Anschluss strikt nach Protokoll (InnuPREP Stool DNA Kit; Analytik Jena) verfahren. Die DNA wurde wieder in 100 µl Elutionspuffer eluiert und bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Konzentration der eluierten DNA wurde im Anschluss, wie in 3.11.4. Bestimmung der Konzentration von genomischer DNA, gemessen. Die isolierte DNA wurde für die qPCR (siehe 3.11.10) und die Metataxonomanalyse (16S rDNA) (siehe 3.13.3. Illumina-Sequenzierung für Metataxonomanalyse) verwendet.

### 3.11.6. RNA-Isolierung

#### RNA-ISOLIERUNG VON FLÜSSIGKULTUREN

Die RNA-Isolierung aller in dieser Arbeit zu untersuchender Proben wurde mit dem RNA Power® Total RNA Isolation Kit (Ouiagen) durchgeführt. Dafür wurden die zu analysierenden *Geobacter*-Kulturen aus dem Adaptationsversuch (siehe 3.8.2. Adaptationsversuch in 75% hA) bei 6000 rpm und 4°C für 10 min abzentrifugiert (Avanti J-26 XP, Beckman Coulter), in 500 µl LifeGuard™ Soil Preservation Solution resuspendiert und in, das dem Kit beigefügte, 15 ml-Reagiergefäß mit darin enthaltenen Mahlkugeln (Karbidskugeln, 0,15 mm; 1,5 g/15 ml Reagiergefäß) gegeben. Im Anschluss wurde nach Herstellerangaben verfahren. Die Isolierung der RNA aus den Zellen beruht auf einer Kombination aus chemischem und mechanischem Zellaufschluss. Chemisch wird hier über SDS aufgeschlossen und mechanisch mittels der bereits genannten Mahlkugeln. Beide Methoden in Kombination erhöhen die Ausbeute an RNA. Mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol kommt es zu einer Phasentrennung, welche die RNA von den anderen Zellbestandteilen abtrennt. Während der Isolierung muss darauf geachtet werden, dass vollkommen Nuklease-frei gearbeitet wird, d.h. alle dafür verwendeten Materialien und auch der Arbeitsplatz müssen vor Kontamination mit Nukleasen geschützt werden und auch vor fremd-Nukleinsäuren, um das spätere Ergebnis nicht zu verfälschen. Am Ende des Protokolls wurde die RNA in 100 µl Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> eluiert.

#### RNA-ISOLIERUNG VON DER ANODE

Für die Isolierung der RNA aus dem Biofilm der Anoden (siehe 3.9.4. Behandlung der Anode für weiterführende Analysen) wurde das 3,5 x 3 cm -große Stück jeder Anode (in 5 ml LifeGuard™ Soil Preservation Solution) in dem 15 ml-Reagiergefäß für 30 min bei 8 Hz auf der Zelmühle geschüttelt, um die Zellen vorsichtig von der

Anode zu lösen. Das Grafitvlies wurde im Anschluss entfernt und die Zellsuspension für 5 min bei 5000 g zentrifugiert (Haraeus Multifuge X1R, Thermo Scientific). Das Zellpellet wurde in 500 µl LifeGuard™ Soil Preservation Solution resuspendiert und, wie in „RNA-Isolierung von Flüssigkulturen“ beschrieben, in das 15 ml-Reagiergefäß mit den darin enthaltenen Mahlkugeln überführt. Ab diesem Schritt wurde ebenfalls weiter nach Protokoll gearbeitet (RNA Power® Total RNA Isolation Kit). Am Ende des Protokolls wurde ebenfalls in 100 µl Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> eluiert.

Die Konzentration der isolierten RNA aus den Flüssigproben und der Anode wurde über den Nanodrop bestimmt (Spectrophotometer Nanodrop 2000, Thermo Scientific) und der Absorptions-Quotient aus 260 nm / 280 nm gemessen. Dieser sollte  $\geq 1,8$  sein, um die Reinheit der RNA aufzuzeigen. Um sicherzustellen, dass sich keine DNA-Rückstände in den Proben befanden, wurde eine PCR mit dem Bacteria-Primer-Paar 1 (siehe 3.11.1. PRC und Tab. 3) durchgeführt. Waren Rückstände zu erkennen, wurde eine DNase-Behandlung durchgeführt (siehe 3.11.7.). Wurden keine Rückstände nachgewiesen, konnten die Proben (bei ausreichender Konzentration: 100 – 500 ng/µl oder 1 µg Gesamt-RNA) zum Institut für Toxikologie und Genetik (ITG) (KIT, Campus Nord) geschickt werden und über Next Generation Sequencing (NGS) sequenziert werden (siehe 3.13.2. Illumina-Sequenzierung für Metatranskriptomanalyse). Vor Ort wurde die Sequenzierung der gesamten RNA durchgeführt. Die RNA wurde bis zur Sequenzierung bei -80°C gelagert.

### **3.11.7. DNaseI-Verdau**

Da nach der RNA-Isolierung teilweise DNA-Rückstände in den Proben zu finden waren, wurde das DNA-free™ Kit zur Abreinigung dieser verwendet. Um sicher zu stellen, dass sich keine DNA mehr in den Proben befand, wurde erneut eine PCR mit dem Bacteria-Primer-Paar 1 (siehe 3.11.1. PRC) für die Amplifizierung von 16S rDNA durchgeführt. Auch hier wurde nach Herstellerangaben verfahren: Die Abreinigung der DNA fand bei 37°C für 25 min statt. Nach dieser Behandlung wurden die Proben, wie in 3.11.6. beschrieben, zum Sequenzieren geschickt.

### **3.11.8. RNA-Amplifikation (aRNA)**

Bei einigen Anoden-Proben brachte die RNA-Isolierung wenig RNA-Ausbeute, d.h. die Konzentration lag deutlich unter der erforderlichen Konzentration von 100 – 500 ng/µl. In diesen Proben wurde zunächst die RNA über Komponenten des MICROBExpress™ Kit (Thermo Fischer) nach Herstellerangaben gefällt und im

Anschluss die RNA mit dem MessageAmp™ II-Bacteria Kit (Thermo Fischer) amplifiziert. Dieses Protokoll basiert auf einer linearen *in vitro* transkriptionsbasierten RNA-Amplifikation (aRNA). Da Bakterien an ihren RNA-Molekülen keinen Poly-A-Schwanz besitzen, wird bei dieser Methode zunächst ein solcher mit Hilfe der *E. coli* Poly(A) Polymerase (PAP) angefügt. Die polyadenylierte RNA wird im nächsten Schritt über einen oligo(dT) Primer mit einem T7 Promotor und einer ArrayScript™ Reversen Transkriptase revers transkribiert. Dabei entsteht cDNA, welche wiederum über eine T7 RNA Polymerase in antisens RNA (aRNA) transkribiert wird. Diese Amplifikation wird nach Herstellerangaben durchgeführt. Zu Beginn werden 5 µl der isolierten und gefällten RNA für die Amplifikation eingesetzt. Die Mindestmenge an eingesetzter RNA sind laut Hersteller 100 ng Gesamt-RNA. Da bei der Isolierung und anschließender Fällung einiger RNA-Proben diese Menge jedoch nicht erreicht wurde, wurde lediglich ca. 20 ng Gesamt-RNA in die Reaktion eingebracht. Das Protokoll wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die amplifizierte aRNA wurde am Ende in 150 µl Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> eluiert.

### 3.11.9. Umschreiben von aRNA in ds cDNA

Die im vorherigen Schritt amplifizierte aRNA wird in einem Folgenden Schritt in doppelsträngige cDNA (ds cDNA) umgeschrieben, um diese dann sequenzieren zu können. Hierfür wurde das SuperScript® DoubleStranded cDNA Synthesis Kit (Thermo Fischer) verwendet. Mit diesem Kit wird in einem ersten Schritt die aRNA mit der SuperScript® II Reversen Transkriptase in einzelsträngige cDNA (ss cDNA) umgeschrieben. Im zweiten Schritt wird über die Verwendung einer *E. coli* RNase H die RNA abgebaut und gleichzeitig mit der *E. coli* DNA Polymerase I der zweite Strang synthetisiert. Das Umschreiben wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die Synthese des ersten Stranges wurde ein Random Hexamer-Primer (0,2 µg/µl; Thermo Scientific) in einem ersten Ansatz und ein Oligo dT Primer (0,5 µg/µl; Thermo Scientific) in einem zweiten Ansatz verwendet. Am Ende des Protokolls wurde in 3 µl Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> eluiert. Beide Ansätze wurden ebenfalls zum Institut für Toxikologie und Genetik (ITG) (KIT, Campus Nord) geschickt und über Next Generation Sequencing (NGS) sequenziert (siehe 3.13.2. Illumina-Sequenzierung für Metatranskriptomanalyse)

### 3.11.10. qPCR (quantitative PCR)

Für die Quantifizierung des Organismus *Geobacter sulfurreducens* (Barcode) auf den Anoden (siehe 3.9.4. Behandlung der Anode für weiterführende Analysen) der einzelnen bioelektrochemischen Systeme, wurde das Verfahren der qPCR angewandt. Bei der quantitativen PCR (qPCR) wird wie bei der herkömmlichen

PCR (siehe 3.11.1.) ebenfalls DNA vervielfältigt. Der Unterschied hierbei ist, dass mit dieser Methode die DNA zusätzlich quantifiziert werden kann. Diese Quantifizierung erfolgt über Fluoreszenzmessungen, wobei nach jedem Zyklus der PCR die Intensität der Fluoreszenz gemessen wird. Die Intensität wird in einer Grafik über die Zyklusanzahl aufgetragen. Während des Kurvenverlaufes sind zwei Phasen zu unterscheiden: die exponentielle Phase und die nicht-exponentielle Phase. Zu Beginn der PCR kann die Fluoreszenz durch die Bindung der Sonde an die DNA nicht von der Hintergrundfluoreszenz unterschieden werden. In der exponentiellen Phase verdoppelt sich die Menge der DNA mit jedem Zyklus und damit steigt auch die Intensität der Fluoreszenz und damit die Fluoreszenz, die durch die Bindung des Farbstoffes an die DNA ausgelöst wird. Dieser Übergang wird als Schwellenwert, bzw.  $c_q$ -Wert (quantification cycle) bezeichnet. Dieser  $c_q$ -Wert ist für jede Probe charakteristisch. Durch den Mangel an PCR-Komponenten erreicht die Reaktion die stationäre, nicht –exponentielle Phase (siehe Abb. 14).

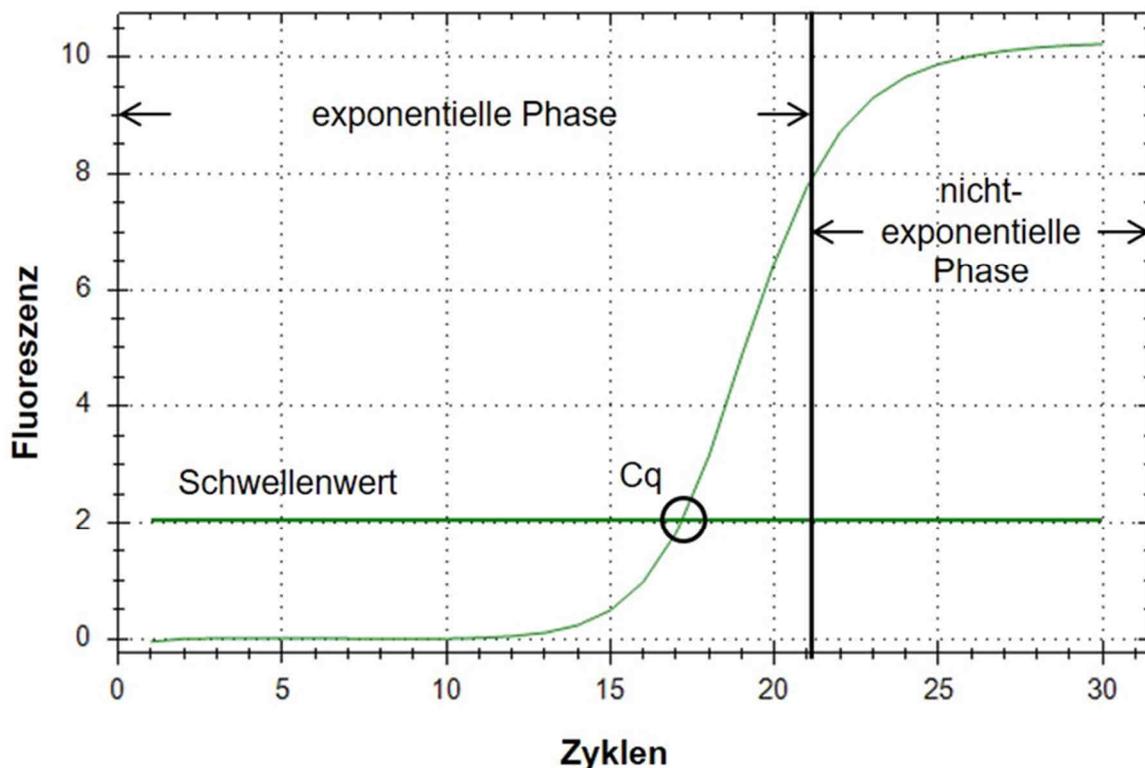


Abbildung 14: Amplifizierungsplot der qPCR. Hier ist die Intensität der Fluoreszenz über die Zyklusanzahl aufgetragen (nach Real-Time PCR Applications Guide, BioRad, 2006).

Hierfür wurde zunächst aus einer 48 h-Kultur von *Geobacter sulfurreducens* (Barcode), mit bekannter  $OD_{600}$ , die Zellzahl (siehe 2.12.1. Bestimmung der Zellzahl) bestimmt. Für die eigentliche Quantifizierung der unbekanntenen Proben (Zellzahlbestimmung von *G. sulfurreducens* auf den Anoden) wurde eine Eichreihe

erstellt: ausgehend von einer 48 h-Kultur des Organismus mit einer  $OD_{600} = 5$ , wurden Verdünnungen dieser hergestellt (1:10, 1:50, 1:100, 1:500 und 1:1000) und die DNA isoliert (siehe 2.10.5. DNA-Isolierung von Flüssigkulturen). Die Eichreihe wurde jeweils im Triplikat hergestellt. Von den Anoden wurde ebenfalls DNA isoliert (siehe 3.11.5. DNA-Isolierung von der Anode). Für die Messung der unbekanntenen Proben konnte nun diese Eichreihe (mit den jeweiligen bekannten Zellzahlen) herangezogen werden. Dafür wurden die Eichreihen und die Proben zusammen in der qPCR gemessen. Unter Berücksichtigung der durch das Programm errechneten  $c_q$ -Werte und der daraus resultierenden Effizienz, konnten nun die Zellzahlen von *Geobacter sulfurreducens* (Barcode) auf den Anoden ermittelt werden. Dafür musste die Effizienz zwischen 90% und 105% liegen und der dazugehörige  $R^2 \geq 0,980$  sein. Zudem wurde über die qPCR ebenfalls die DNA-Konzentration von *G. sulfurreducens* der Proben ermittelt, indem bei der Messung nicht die Zellzahl, sondern das Fluoreszenzsignal entsprechend der DNA-Konzentration der Eichreihe (1:10, 1:50, 1:100, 1:500 und 1:1000) dargestellt wurde. Die Konzentration an *Geobacter*-DNA in den Proben wurde dann in Bezug zu der gemessenen Gesamt-DNA (siehe 3.12.7.) gesetzt.

Als Fluoreszenzfarbstoff wurde in dieser Arbeit SYBR Green I verwendet. Der Farbstoff zeigt ungebunden kaum Fluoreszenz, an doppelsträngige DNA gebunden jedoch kann dieser bis zu 1000 x stärker fluoreszieren (siehe Abb. 15).

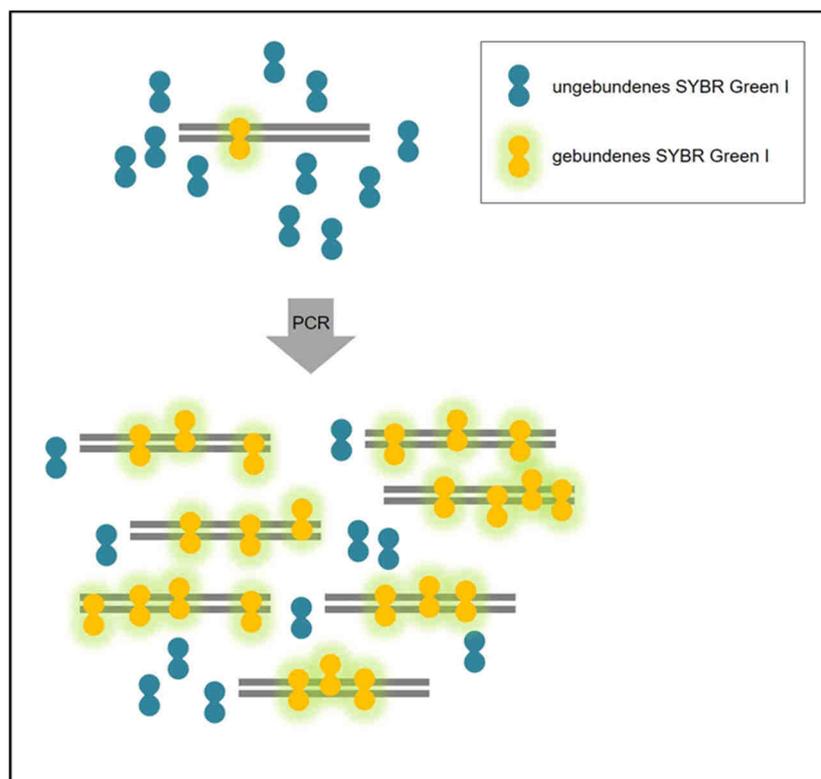


Abbildung 15: Vereinfachtes Schema der Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green I an die DNA. Durch die Bindung an dsDNA wird die Fluoreszenz verstärkt (nach Real-Time PCR Applications Guide, BioRad, 2006).

Der verwendete Mix (2 x konzentriert) SsoAdvanced™Universal SYBR®Green Supermix (Biorad) für den PCR-Ansatz enthielt neben dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I ebenfalls alle notwendigen Komponenten (mit Ausnahme der Primer) für die PCR: Sso7d-fusion Polymerase, die dNTP's, MgCl<sub>2</sub> und Stabilisatoren für die Reaktion. Das verwendete Primer-Paar 4 G.s. barcoding qPCR for und G.s. barcoding qPCR rev wurde für den Stamm *Geobacter sulfurreducens* Barcode für die qPCR-Anwendung abgeleitet (Dolch *et al.*, 2015).

#### Reaktionsansatz für die qPCR:

- 10 µl 2 x Supermix
- 2,5 µl Primer Forward (4 pmol/µl)
- 2,5 µl Primer Reverse (4 pmol/µl)
- 1 µl DNA

} 20 µl - Ansatz

#### PCR-Protokoll für die qPCR:

- 3 min - 95°C Denaturierung
- 5 s - 95°C Denaturierung
- 30 s - 55,4°C Primer-Bindung
- Messung der Fluoreszenz
- 30 s - 60°C Elongation
- 10 s - 60°C finale Elongation
- 5 s /0,5°C - 60°C → 98°C Schmelzkurve

} 29 Zyklen

Für die optimale Temperatur zur Anlagerung der Primer wurde eine Temperaturgradienten-qPCR von 53°C – 65°C durchgeführt. Die optimale Temperatur lag bei 55,4°C. Alle qPCR-Läufe wurden in weißen Polypropylen-Platten (4titude; Wotton, Großbritannien) mit durchsichtigen Deckeln (Strips of 8 Flat Optically Clear, 4titude; Wotton, Großbritannien) in dem qPCR-Cycler CFX96 (Biorad) durchgeführt. Im Anschluss wurden die Ergebnisse mit dem Programm Biorad CFX Manager ausgewertet und 10 µl der Ansätze auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen.

### **3.11.11. FISH (Fluorescence In Situ Hybridization)**

Bei der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung können Bakterien und Bakterienzusammensetzungen direkt und in ihrer `ursprünglichen Position` („*in situ*“) in biologischen Proben nachgewiesen werden. Die Methode basiert auf der Hybridisierung zweier einzelsträngig vorliegender Nukleinsäuren zu einem Doppelstrang. Wobei in den meisten Fällen DNA-Sonden verwendet werden, die

an die rRNA (5S, 16S oder 23S rRNA) der Bakterienzellen bindet. Diese Sonden sind künstlich hergestellte Oligonukleotide, die an solche spezifischen Bereiche binden und am 5' Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff versetzt sind. Bindet nun eine solche Sonde mit der ihr komplementären rRNA, kann man diese Bindung und damit das Vorhandensein der Bakterien mittels Fluoreszenzmikroskopie (siehe 3.15.3) nachweisen. In dieser Arbeit wird die 16S rRNA als Zielsequenz ausgewählt, da in einer vitalen Bakterienzelle eine Vielzahl von Ribosomen vorhanden sind und somit das Fluoreszenzsignal automatisch verstärkt wird (DeLong *et al.*, 1989).

### - Fixierung der Proben -

Zu Beginn werden die Bakterienzellen fixiert, d.h. durch das Behandeln mit entsprechenden Fixierungsmitteln (chemisch) wird gewährleistet, dass die Morphologie der Zellen erhalten bleibt. Die Moleküle (hauptsächlich Proteine) in der Zelle werden durch die eingesetzten Chemikalien miteinander vernetzt (Bsp.: Bei Verwendung von Formaldehyd kommt es zu einer Quervernetzung der Aminogruppen der Proteine mit den Aldehydgruppen der Chemikalie), so kann der Proteinstatus in der Zelle aufrechterhalten werden. Ein Fixiermittel sollte also gut vernetzen und stabilisieren, schnell eindringen und abtöten und nichts beeinflussen. Es können verschiedene Fixiermittel für die Fixierung verwendet werden. In dieser Arbeit wurde Formaldehyd verwendet.

### FIXIERUNG VON FLÜSSIGKULTUREN

2 ml einer Bakterienkultur wurden 2 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Fixierlösung mit 4% Formaldehyd (Tab. 22) aufgenommen und für 1 h bei 4°C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen erneut pelletiert (2 min, 10000 rpm), in 500 µl 1 x PBS (Tab. 21 10 x PBS-Puffer, Verdünnung 1:10 in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>) aufgenommen und zweimal gewaschen (2 min bei 10000 rpm).

Danach wurden die Zellen in 500 µl – 2 ml (abhängig von der Menge der Zellen) 1 x PBS / 100% EtOH (50 / 50, v / v) aufgenommen. An dieser Stelle konnten die fixierten Proben über mehrere Monate bei -20°C gelagert werden (Amann *et al.*, 1990).

*Tabelle 21: Zusammensetzung des 10 x PBS-Puffers.*

10 x PBS	Einwaage [g]	Endkonzentration
NaCl	80	1,4 M
KCl	2	26,8 mM

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	7,64	42,9 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2	14,7 mM

auf pH 7,5 einstellen

H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	ad 1 L
--------------------------------	--------

*Tabelle 22: Zusammensetzung der Fixierlösung bei Flüssigkulturen.*

Fixierlösung	Volumina [ml]	Endkonzentration
10 x PBS (Tab. 21)	100	1 x
37% Formaldehyd	108	4%
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	ad 1L	

## IMMOBILISIEREN DER FLÜSSIGKULTUREN

Nach dem Fixieren der Flüssigkulturen werden je 10 µl der Proben in die Wells der Slides (Diagnostic Microscope Slides, ER-201B-CE24, 8 well 6 mm Numbered; Thermo Scientific; Portsmouth, USA) pipettiert und bei 37°C angetrocknet und im Anschluss mit 0,1% low melt Agarose in 1 x PBS überschichtet und komplett getrocknet. An dieser Stelle können die Proben bei 4°C gelagert werden.

## FIXIERUNG VON BIOFILMEN AUF ANODEN

Für das Fixieren der Zellen auf den Anoden der Brennstoffzellen werden 1 cm<sup>2</sup> große Stücke von der Anode mit einem sterilen Skalpell entfernt (siehe 2.8.4. Behandlung der Anode für weiterführende Analysen) und in Peel-A-Way Embedding Molds (Square/S22, Polysciences, Eppelheim) mit der Fixierlösung (Tab. 23) überschichtet und für ca. 4 h bei 4°C fixiert. Im Anschluss werden die Anoden mit den Zellen für 30 min und 4°C in Kathodenmedium (Tab. 16) gewaschen. Durch Überschichten der Anoden mit Kathodenmedium/100% EtOH (50/50, v/v) kann die Probe für mehrere Monate bei -20°C in luftdichten Gefäßen gelagert werden.

*Tabelle 23: Zusammensetzung der Fixierlösung bei Anoden.*

Fixierlösung	Volumina [ml]	Endkonzentration
Kathodenmedium (Tab. 16)	89,2	-
37% Formaldehyd	10,8	4%

### **- Dedyrierung der Proben -**

#### DEHYDRIERUNG (FLÜSSIGKULTUREN)

Die Kulturen auf den Slides werden mit einer aufsteigenden Ethanol-Reihe dehydriert:

3 min 50% Ethanol, 3 min 80% Ethanol und 3 min 100% Ethanol.

Nach der Behandlung mit 100% Ethanol werden die Slides bei 37°C getrocknet und können nach der Trocknung optional bei 4°C gelagert werden.

Die Anodenstücke werden an dieser Stelle nicht dehydriert.

### **- Permeabilisierung der Membran der Proben -**

Für die Permeabilisierung der Zellen des Konsortiums (bestehend aus den Isolaten und *Geobacter sulfurreducens*) auf den Anoden wurde ein zusätzlicher Permeabilisierungsschritt mit 0,5% SDS in Kathodenmedium durchgeführt. Der Grund hierfür ist die Beschaffenheit der Zellwand von Gram-positiven Bakterien (Roller *et al.*, 1994).

#### PERMEABILISIERUNG (FLÜSSIGKULTUREN)

Zunächst wurden die kompletten Slides für 10 min in 0,1% HCl getaucht, kurz mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gespült und im Anschluss für 10 min in 0,5% SDS in 1 x PBS gegeben. Danach werden die Proben ein zweites Mal mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gespült. Diese Schritte finden bei RT statt. Die Proben werden nach dem Spül-Schritt mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> bei 37°C getrocknet.

#### PERMEABILISIERUNG (ANODEN)

Zunächst werden auch hier die Anodenstücke in den Embedding Molds für 10 min mit 0,1% HCl überschichtet, kurz mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gespült und im Anschluss für 10 min in 0,5% SDS in Kathodenmedium gegeben. Danach werden die Proben mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gespült. Auch hier fanden die Schritte bei RT statt. Die Anoden wurden nicht getrocknet, sondern direkt für die Hybridisierung vorbereitet.

### **- Hybridisierung der Sonden mit dem Probenmaterial -**

Die Hybridisierung der Proben der Flüssigkulturen und auch der Anoden fand im Dunkeln statt, da hier die lichtempfindlichen Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt an

den Sonden (siehe Sonden Tab. 4, Tab. 25 und verwendete Fluoreszenzfarbstoffe Tab. 30, siehe 3.15.3. Fluoreszenzmikroskopie) zu der Probe gegeben wurden.

### HYBRIDISIERUNG (FLÜSSIGKULTUREN)

Für die Hybridisierung wurden die Slides mit den Proben mit Working Solution (Tab. 24) beschichtet (ca. 10 -15 µl pro Well). Diese enthält die mit den Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten Sonden (siehe Tab. 25). Ab diesem Zeitpunkt musste im Dunkeln gearbeitet werden. Die Sonden werden in einer Konzentration von 50 µg/ml eingesetzt.

Die Hybridisierung findet bei 46°C für 2 h statt. Damit die Proben während dieser Inkubationszeit nicht austrocknen, wurden für die Hybridisierung der Slides sog. feuchte Kammern mit der entsprechenden Formamid-Konzentration hergestellt (siehe Tab. 27).

*Tabelle 24: Zusammensetzung der Working Solution.*

Working Solution	Volumina [ml]
je Sonde	0,1
Hybridisierungspuffer	ad 1,5

*Tabelle 25: In der Arbeit verwendete Sonden mit den gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen.*

Sonden/ Bindestelle	Sequenz 5' → 3' mit gekoppeltem Fluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende	Zielorganismen
Ent/ 16S rRNA	[Cy3]CCCCWCTTTGGTCTTGC	<i>Entrobacteriaceae</i>
LGC/ 16S rRNA	[Cy5]TCACGCGGCGTTGCTC	Firmicutes
Geo_2/ 16S rRNA	[FITC]GAAGACAGGAGGCCCGAAA	<i>G. sulfurreducens</i>
Geo_2/ 16S rRNA	[Cy3]GAAGACAGGAGGCCCGAAA	<i>G. sulfurreducens</i>
HGeo_2.1/ Helfersonde 1 für Geo_2	GTCCCCCCTTTTCCCGCAAGA	
HGeo_2.2/	CTAATGGTACGCGGACTCATCC	

Helfersonde 2  
für Geo\_2

EUB338-1/ [Cy3]GGTTACCTTGTTACGACTT Bacteria  
16S rRNA

Um die jeweils benötigte Formamid-Konzentration gewährleisten zu können, musste bei der Herstellung der Working Solution darauf geachtet werden, dass nicht weniger als 1,2 ml Hybridisierungspuffer verwendet wurde, d.h. wurden mehr als 3 Sonden, bzw. Helfer-Oligonukleotide verwendet, mussten die Sonden, bzw. Helferoligonukleotide in einer höheren Konzentration eingesetzt werden.

Bei der Herstellung des Hybridisierungspuffers wurden, je nach Sondentyp, bestimmte Formamid-Konzentrationen verwendet (Tab. 26). Wurde mit unterschiedlichen Sonden gearbeitet, die verschiedene Formamid-Konzentrationen benötigen, wurde zuerst mit der höheren Konzentration hybridisiert.

Die Sonden Geo\_2, EUB 338-1 und Ent benötigten eine Formamid-Konzentration von 20%, die LGC-Sonde wurde bei einer höheren Konzentration hybridisiert, 30%-35%.

*Tabelle 26: Zusammensetzung des Hybridisierungspuffers.*

Hybridisierungspuffer	Volumina [ml]		
	für 20% FA	für 30% FA	für 35% FA
5 M NaCl	1,08	1,08	1,08
1 M tris-HCl (pH 8,0)	0,12	0,12	0,12
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	3,6	3,0	2,7
20% SDS*	0,003	0,003	0,003
Formamid	1,2	1,8	2,1

\*Um das SDS in Lösung zu bringen, wurde der Puffer auf 60°C im Wasserbad erhitzt und im Anschluss auf Eis abgekühlt. Erst dann konnte das Formamid in der entsprechenden Konzentration dazugegeben werden.

Vor Gebrauch musste der Puffer steril filtriert werden (0,2 µm). Der Hybridisierungspuffer konnte nach der Herstellung bei -20°C gelagert werden.

Tabelle 27: Zusammensetzung der Lösung für die feuchte Kammer.

Lösung feuchte Kammer	Volumina [ml]	Volumina [ml]	Volumina [ml]
	für 20% FA	für 30% FA	für 35% FA
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	1,6	1,4	1,3
Formamid	0,4	0,6	0,7

Für die Verwendung einer feuchten Kammer wurde ein Kimtech-Tuch (Kimberly Clark Präzisionstücher, KIMTECH SCIENCE (KC 7552)) in ein 50 ml-Falcongefäß gegeben und mit 2 ml der entsprechenden Lösung (siehe Tab. 27) überschichtet. Das überschichtete Tuch wurde in dem Gefäß weit nach unten geschoben, sodass das Slide mit den Kulturen ebenfalls in das Falcongefäß eingebracht werden konnte.

#### HYBRIDISIERUNG (ANODEN)

Für die Hybridisierung wurden die Anodenstücke mit 1,5 ml Working Solution (siehe Tab. 24) in den Embedding Molds bedeckt. Auch hier wurde ab diesem Zeitpunkt im Dunkeln gearbeitet. Die Sonden wurden in einer Konzentration von 50 µg/ml eingesetzt. Die Hybridisierung fand bei 46°C für 2 h statt (Herstellung und Zusammensetzung der Lösungen siehe Hybridisierung Flüssigkulturen). Auch hier wurde zuerst mit der höheren Formamid-Konzentration hybridisiert, falls Sonden mit unterschiedlich benötigten Formamid-Konzentrationen verwendet wurden.

#### - Waschen -

##### WASCHEN (FLÜSSIGKULTUREN)

Die Slides mit den Kulturen wurden zunächst kurz in Waschpuffer (48°C) (siehe Tab. 28) getaucht, anschließend mit frischem Waschpuffer überschichtet und für 15 min bei 48°C inkubiert. Der Waschpuffer wurde zuvor auf eine Temperatur von 48°C gebracht. Im Anschluss wurden die Kulturen auf den Slides kurz in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gewaschen und für 10 min bei RT mit 1 x SSC (siehe Tab. 29, für 1 x SSC 1:10 Verdünnung in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>) überschichtet. Nach dem Waschen in 1 x SSC wurde nochmals kurz mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gewaschen.

Bei der Herstellung des Waschpuffers wurden ebenfalls je nach verwendeter Formamid-Konzentration, unterschiedliche Zusammensetzungen benötigt.

Tabelle 28: Zusammensetzung des Waschpuffers.

Waschpuffer	Volumina [ml]	Volumina [ml]	Volumina [ml]
-------------	---------------	---------------	---------------

	für 20% FA	für 30% FA	für 35% FA
5 M NaCl	2,15	1,02	0,7
1 M tris-HCl (pH 8,0)	1	1	1
0,5 M EDTA (pH 8,0)	0,5	0,5	0,5
20% SDS	0,025	0,025	0,025
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	ad 50 ml	ad 50 ml	ad 50 ml

*Tabelle 29: Zusammensetzung von 20 x SSC.*

20 x SSC	Einwaage [g]	Endkonzentration
NaCl	175,3	3 M
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	88,2	0,3 M
pH 6,0		
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	ad 1 L	

Wurden Sonden mit unterschiedlicher Formamid-Konzentration für die Hybridisierung verwendet, wurde an dieser Stelle die Hybridisierung mit der zweiten Sonde und ein zusätzlicher Waschschrift durchgeführt.

### WASCHEN (ANODEN)

Die Anoden wurden zunächst ebenfalls kurz mit Waschpuffer (48°C) (siehe Tab. 28) überschichtet. Anschließend wurde frischer Waschpuffer über das Anodenstück gegeben und 15 min bei 48°C inkubiert (Herstellung Waschpuffer siehe Waschen Flüssigkulturen). Im Anschluss wurden die Anoden ebenfalls kurz in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gewaschen und dann für 10 min und RT mit 1 x SSC (Tab. 29, für 1 x SSC 1:10 Verdünnung in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>) überschichtet und nochmals kurz in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gewaschen.

### - DAPI-Färbung -

#### DAPI-FÄRBUNG (FLÜSSIGKULTUR)

DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) ist ebenfalls ein Fluoreszenzfarbstoff, der an AT reiche Regionen in der kleinen Furche der DNA bindet und somit zum Nachweis von DNA verwendet wird. Für die DAPI-Färbung wurde eine DAPI-Lösung mit einer Konzentration von 1 µg/ml verwendet (Stock-Lösung: 1 mg/ml, Aufbewahrung bei 4°C). 10-15 µl der DAPI-Lösung wurde pro Well des Slides auf die Probe gegeben und für 5 min inkubiert. Im Anschluss wurde zwei Mal für 1 min

mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  gespült und kurz in 100% EtOH getaucht. Danach wurden die angefärbten Proben trocknen gelassen.

Nach der Färbung mit DAPI wurden die Proben eingebettet, um eine Art Dauerpräparat zu erhalten. Der Einbettpuffer (siehe Tab. 30) wurde im Dunkeln hergestellt und direkt auf die Probe gegeben. Im Anschluss wurde ein Deckglas (24 x 60  $\text{cm}^2$ , Roth, Karlsruhe) zum Abdecken der Proben auf das Slide gelegt. So konnten die angefärbten Proben unter dem Mikroskop betrachtet werden und über einen längeren Zeitraum bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert werden.

*Tabelle 30: Zusammensetzung des Einbettpuffers.*

Einbettpuffer	Volumina [ml]
Citiflour	1,1
Vectashield	0,2
1 x PBS	0,1

## DAPI-FÄRBUNG (ANODEN)

Die DAPI-Färbung von Anoden wurde gleich der der Flüssigkulturen durchgeführt, mit Ausnahme der zu herstellenden Menge an DAPI-Lösung. Um die Anoden mit der Lösung überschichten zu können, wurde pro Anode, ca. 1,5 ml der Lösung benötigt. Die weitere Vorgehensweise war gleich der der Flüssigkulturen.

Die Anoden wurden nach der Färbung nicht eingebettet. Sie werden in einer Petrischale, mit Aluminiumfolie (zum Schutz der Fluoreszenzfarbstoffe) umschlossen, im Kühlschrank aufbewahrt.

## 3.12. Analytische Methoden

### 3.12.1. HPLC (High Performance Liquid Chromatographie)

Die Konzentrationen der unterschiedlichen Kohlenstoffquellen und deren Endprodukte (hauptsächlich organische Säuren), der verschiedenen Versuche, wurden mittels HPLC bestimmt. Dies ist ein chromatographisches Trennverfahren, bei dem Substanzen identifiziert und vor allem auch quantifiziert werden können. Für die Analyse wurde 1 ml der jeweiligen Probe über einen Filter mit einer Porengröße von  $0,2 \mu\text{m}$  (PTFE; VWR) filtriert. Bis zu Analyse der Proben konnten diese bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert werden. Für die eigentliche Messung wurden  $100 \mu\text{l}$  der Probe mit  $10 \mu\text{l}$   $0,5 \text{ M H}_2\text{SO}_4$  (ebenfalls mit einem Filter mit  $0,2 \mu\text{m}$  Porengröße

filtriert) versetzt. Pro Messung wurden 50 µl der angesäuerten Proben mit einer Flussrate von 0,6 ml/min, einem konstanten Druck von 44 bar und 60°C über die Säule (Aminex HPX-87H, 300 x 7,8 mm; Biorad) transportiert. Als Laufmittel wurde 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, basierend auf einer isokratischen Trennung verwendet. Die Messung einer Probe dauerte 45 min und nach je 3 Proben wurde ein Spülschritt mit 50 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> durchgeführt, um die Säule zu reinigen. Dieser dauerte ebenfalls 45 min. Für die Bestimmung der organischen Säuren wurde die HPLC Elite LaChrom (HITACHI, VWR) und ein Dioden Array Detektor (DAD, L-2455, HITACHI) verwendet. Der Detektor erfasst Analyten, die im UV/VIS-Bereich absorbieren. In dieser Arbeit wurde bei einer Wellenlänge von 220 nm gemessen und so vor allem –C=O – Verbindungen in den Proben nachgewiesen. Die Auswertung erfolgte über die Elite LaChrom Software (HITACHI, VWR). Die Detektion von Glukose wurde mit der HPLC Dionex UltiMate 3000 von Thermo Scientific und einem RI-Detektor (Brechungsindex-Detektor, engl.: **R**efractive **I**ndex **D**etector) (Refracto Max 520; ERC) durchgeführt. Dieser Detektor ist in der Lage Analyten nachzuweisen, die keine, bzw. eine zu geringe UV-Absorption aufweisen, um sie mit dem Dioden Array Detektor zu bestimmen. Er bestimmt den Brechungsindex einer Substanz relativ zu dem Laufmittel. Mit dem RI-Detektor wurde der Einfachzucker Glukose quantifiziert. Die Auswertung der Analysen erfolgte mit der Chromeleon Software (Dionex; Thermo Fisher Scientific).

Für die Quantifizierung der in den Proben enthaltenen organischen Säuren und der Glukose wurden Standards mit bestimmten Konzentrationen hergestellt und gleich den Proben behandelt. Die Analyse-Parameter der Standards entsprachen der, der Proben. Eine Ausnahme war hier jedoch die Laufzeit von lediglich 30 min.

### 3.12.2. TOC (Total Organic Carbon) und TN (Total Nitrogen)

Mit Hilfe des TOC-Analysators multi N/C 2100S (Analytik Jena) wurde der gesamte Stickstoff und organische Kohlenstoff und damit die organische Belastung, der in dieser Arbeit verwendeten Abwasserproben (flüssige Proben des Klärwerks und der Experimente) bestimmt. Bei dieser Methode wird der TOC (totaler organischer Kohlenstoff, engl.: **T**otal **O**rganic **C**arbon) aus der Differenz des TC (totaler Kohlenstoff, engl.: **T**otal **C**arbon) und des TIC (totaler anorganischer Kohlenstoff, engl.: **T**otal **I**norganic **C**arbon) berechnet:

$$TC - TIC = TOC \quad (7)$$

Aus der gleichen Probe werden in unterschiedlichen, aufeinanderfolgenden Messungen erst der TIC und dann der TC bestimmt. Bei der Messung des TIC wird die Probe zunächst mit 10% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Ortho-Phosphorsäure; wird zunächst mit

N<sub>2</sub> begast, um mögliches CO<sub>2</sub> der Säure auszutreiben) angesäuert, welche mit den anorganischen Kohlenstoffverbindungen unter Bildung von CO<sub>2</sub> reagiert. Das ausgetriebene CO<sub>2</sub> der Probe wird über ein NDIR-Detektor (**N**icht**D**ispersiv **I**nfrarot**A**bsorption-**D**etektor) detektiert, indem aus der gemessenen Signalabfolge ein Integral über die Zeit gebildet wird. Hierbei ist das Signal proportional zur Konzentration der Kohlenstoffverbindungen in den Proben. Die Konzentration der Proben wird über eine zuvor kalibrierte Eichreihe mit bestimmten Konzentrationen automatisch errechnet. Nach der Messung des TIC wird der TC ermittelt. Hier wird der gesamte Kohlenstoff (organisch und anorganisch gebundener Kohlenstoff) in den Proben gemessen, indem die Probe direkt ins Verbrennungsrohr injiziert und dort bei 800°C verbrannt wird. Das ausgetriebene CO<sub>2</sub> wird auch hier über den NDIR-Detektor gemessen.

Die Bestimmung der Konzentration des Gesamtstickstoffs (TN) im Abwasser erfolgte parallel zu der Messung des TCs. Über das beschriebene Verbrennungsverfahren werden Stickstoffverbindungen in NO und NO<sub>2</sub> umgesetzt. Im Anschluss wird NO<sub>2</sub> zu NO reduziert und mithilfe von O<sub>3</sub> oxidiert, wobei für kurze Zeit angeregtes NO<sub>2</sub><sup>+</sup> entsteht. Beim Zurückfallen in den Ursprungszustand (NO<sub>2</sub>) kommt es zu einer Strahlungs-Emission im Bereich von sichtbarem Licht. Dieses wird über einen Chemolumineszenz-Detektor (CLD) erfasst. Die Intensität ist hierbei proportional zur Menge an NO<sub>2</sub><sup>+</sup> und damit auch zur Gesamtstickstoff-Konzentration.

Für die Messung wurden die Proben 1:50 und 1:100 mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> verdünnt und in 2 ml Probengefäße gegeben. Pro Messung (TIC- und TC-Messung) wurde ein Volumen von 200 µl über eine gasdichte Spritze injiziert, wobei der TIC und der TC jeweils in einer Doppelbestimmung gemessen wurden. Lagen beide gemessenen Werte mehr als 2% auseinander, wurde ein drittes Mal gemessen. Die Auswertung erfolgte über die Software multiWin® (Analytik Jena)

### 3.12.3. IC (Ionenchromatographie)

Die Ionenchromatographie ist ein chromatographisches Verfahren, welches die Trennung von Ionen und damit die Quantifizierung dieser ermöglicht. In dieser Arbeit wurde das Verfahren eingesetzt, um die Phosphat (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>)-Konzentration im Abwasser zu bestimmen. Für die Analyse wurden die Proben (hA Abwasser) zunächst über einen Filter (Porengröße von 0,2 µm, PTFE; VWR) filtriert. Für die eigentliche Messung wurde das Abwasser 1:10 und 1:20 mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> (ebenfalls vorher filtriert), in einem Probenvolumen von 2 ml, verdünnt. Pro Messung wurde das komplette Probenvolumen mit einer Flussrate von 0,25 ml/min, einem

konstanten Druck von 1600 psi und 30°C über die Anionensäule (IonPac AS9-HC; 2 x 250 mm, Dionex; Thermo Fisher Scientific) transportiert. Als Laufmittel wurde 9 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> verwendet und die Messung einer Probe dauerte 45 min. Nach jeder Probe wurde ein Spülschritt mit 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> durchgeführt, um die Säule zu reinigen. Dieser dauerte ebenfalls 45 min. Für die Quantifizierung von Phosphat in dem Abwasser wurden der Ionenchromatograph Dionex ICS-1100 (Thermo Fisher Scientific) und ein Leitfähigkeitsdetektor (DS6 Heated Conductivity Cell, Thermo Fisher Scientific) verwendet. Vor der Leitfähigkeitsmessung am Detektor durchläuft die Probe einen Suppressor (AERS 500 Carbonate Anion Electrolytically Regenerated Suppressor for Carbonate Eluents, 2 mm, Dionex; Thermo Fisher Scientific) der die Grundleitfähigkeit des Eluenten senkt, um die Leitfähigkeitsmessung der Ionen nicht zu beeinträchtigen. Um die Phosphatkonzentration quantifizieren zu können, wurden Phosphat-Standards mit bestimmten Konzentrationen hergestellt und gleich den Proben behandelt. Auch die Analyse-Parameter stimmten mit denen, der Proben überein.

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0,025 mM, 0,05 mM, 0,1 mM, 0,2 mM, 0,3 mM, 0,4 mM, 0,5 mM, 0,75 mM, 1,0 mM, 1,5 mM

Die Auswertung der Analysen erfolgte mit der Chromeleon Software (Dionex; Thermo Fisher Scientific).

#### **3.12.4. Hach-Lange Küvetten-Tests**

Die Bestimmung der Stickstoffverbindungen, wie Ammonium, Nitrat und Nitrit im hA-Abwasser, wurde mit den Küvetten-Tests von Hach-Lange durchgeführt. Vor der Messung wurden die Abwasser-Proben zunächst filtriert (Porengröße von 0,2 µm, PTFE; VWR) und im Anschluss für jeden Test entsprechend verdünnt:

- (1) Ammonium Küvetten-Test 0,02 - 2,5 mg/L NH<sub>4</sub>: 1:200 Verdünnung
- (2) Nitrat Küvetten-Test 1 - 60 mg/L NO<sub>3</sub>: 1:10 Verdünnung
- (3) Nitrit Küvetten-Test 2 - 20 mg/L NO<sub>2</sub>: 1:20 Verdünnung

Die Messung der Proben wurde nach Herstellerangaben in einem Spektralphotometer durchgeführt (DR 3900; Hach-Lange; Weinheim).

#### **3.12.5. Leitfähigkeitsmessung**

Die Leitfähigkeit des Abwassers von hinter dem Absetzzyklon der Firma Solvay wurde HI 99300 EC/TDS Leitfähigkeitsmesser (HANNA Instruments, Kehl am Rhein, Germany) bestimmt.

### 3.12.6. Ferrozine-Assay (colorimetrische Bestimmung von Fe<sup>2+</sup>)

Zur Bestimmung der Fe<sup>3+</sup>-Reduktion in den Wachstumsversuchen der Organismen wurde über einen colorimetrischen Nachweis Fe<sup>2+</sup> in den Zellsuspensionen bestimmt. Das durch Fe<sup>3+</sup>-Reduktion entstehende Fe<sup>2+</sup> bildet mit Ferrozine (Dinatrium-4-[3-pyridin-2-yl-6-(4-sulfonatophenyl)-1,2,4-triazin-5-yl]benzosulfonat) einen magentafarbenen Komplex, der bei einer Wellenlänge von 562 nm seine maximale Extinktion aufweist (Stookey, 1970). Hierbei ist die Menge von reduziertem Fe<sup>3+</sup> proportional zu der Menge an entstehendem Fe<sup>2+</sup>. Die Proben der einzelnen Wachstumsversuche wurden zuvor, wie in 2.5 Wachstumsversuche der Isolate beschrieben, 1:10 mit 1 M HCl verdünnt, um die Oxidation von Fe<sup>2+</sup> zu Fe<sup>3+</sup> zu verhindern. Zudem wurden ausgehend von dieser Verdünnung weitere Verdünnungen hergestellt (1:20 und 1:40). 20 µl jeder Verdünnung der einzelnen Proben wurden nun mit 180 µl Ferrozine-Reaktionslösung (1 mg/ml Ferrozine in 50% Ammoniumacetat-Lösung) versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit konnte die Extinktion bei einer Wellenlänge von 562 nm im Photometer gemessen werden (Tecan, Infinite 200 pro; Programm: i-control). Als Standard- Eichreihe wurden Fe<sup>2+</sup>-Lösungen mit den Konzentrationen 0 mM; 0,25 mM; 0,5 mM; 0,75 mM; 1 mM Fe<sup>2+</sup> (Ammonium-Eisen-Sulfat) in 1 M HCl hergestellt und für die Messung gleich den Proben behandelt.

### 3.12.7. Qubit® dsDNA High-Sensitivity Kit

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Konzentration von genomischer DNA ist die Verwendung des Qubit® dsDNA High-Sensitivity Kit. Hier können Konzentrationen von 0,2 bis 100 ng doppelsträngiger DNA photometrisch, aufgrund eines Fluoreszenzfarbstoffes, bestimmt werden. Der entstehende DNA-Farbstoff-Komplex absorbiert Licht der Wellenlänge  $\lambda = 485$  nm und emittiert Licht der Wellenlänge  $\lambda = 530$  nm. Die Bestimmung erfolgte nach Herstellerangaben: 10 µl der mitgelieferten Standards (0 ng/ µl und 10 ng/ µl) und der Proben wurden mit 190 µl Working Solution (Qubit® dsDNA HS Reagent 1:200 in Qubit® dsDNA HS Puffer) bei RT für 3 min inkubiert und im Photometer (Tecan, Infinite 200 pro; Programm: i-control) gemessen. Diese Methode wurde zur Messung der isolierten DNA aus den Versuchen zur qPCR verwendet.

## 3.13. Sequenzierungsmethoden

### 3.13.1. Sequenzierung nach Sanger

Die Sequenzierungen der 16S rDNA zur Identifizierung der Isolate wurde über die Sequenzierung nach Sanger (Sanger *et al.*,1977) von der Firma eurofins genomics (Ebersberg) durchgeführt. Die Sequenzierung nach Sanger beruht auf der Kettenabbruchsynthese über Fluoreszenz-markierte Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTP's). Hierfür wurden die DNA-Proben zusammen mit den, bei der PCR verwendeten Primern, nach Herstellerangaben zum Versand vorbereitet. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm Geneious (Biomatters; Auckland, New Zealand) ausgewertet und für die phylogenetische Einordnung der isolierten Organismen aus den Abwässern werden die erhaltenen Sequenzen einer BLAST-Suche (siehe 3.14.1. BLAST) unterzogen.

### 3.13.2. Illumina-Sequenzierung für Metatranskriptomanalyse

Die Sequenzierung der isolierten RNA erfolgte über die sog. Illumina-Sequenzierung, welche zu der Next Generation Sequencing Technologie gehört. Bei dieser schnellen Art der Sequenzierung, wird die RNA zunächst in cDNA umgeschrieben (siehe 3.11.6. RNA-Isolierung; entfällt bei den Proben, die amplifiziert wurden, siehe 3.11.8. und 3.11.9.), um diese dann zu fragmentieren. Die doppelsträngigen Fragmente werden mit Adaptern versehen und vervielfältigt. Diese Adapter werden an beiden Seiten der jeweiligen Einzelstränge des Doppelstranges angebracht, diese sog. „paired-end“-Sequenzierung ermöglicht die Sequenzierung von beiden Seiten des Stranges und erhöht damit die Qualität dieser. Im Anschluss wird die DNA denaturiert und die Einzelstränge können auf eine Trägerplatte aufgebracht werden. Diese Trägerplatte enthält Oligonukleotide, die komplementär zu den angefügten Adaptern sind. Über Brückenamplifikation können die verschiedenen Stränge vervielfältigt werden. Für die eigentliche Sequenzierung werden dann zunächst alle forward-Einzelstränge mit Hilfe einer Polymerase zum Doppelstrang synthetisiert. Hierbei werden fluoreszenzmarkierte Basen eingebaut, die beim Einbau ein Signal abgeben. Dieses Signal wird aufgezeichnet. Im Anschluss werden die revers-Einzelstränge zum Doppelstrang synthetisiert und deren Fluoreszenz-Signal aufgezeichnet. Somit können zeitgleich eine Vielzahl von Strängen synthetisiert und gleichzeitig sequenziert werden durch die Aufzeichnung der Abfolge der unterschiedlichen Fluoreszenzsignale, die an bestimmten Stellen der Trägerplatte entstehen. Am Ende werden alle Signale ausgewertet und somit die RNA sequenziert. Diese Sequenzierung wurde am Institut für Toxikologie und Genetik (ITG) (KIT, Campus Nord) durchgeführt. Für alle Proben wurde eine Total RNA Library Preparation durchgeführt und im High

Throughput Mode 2 x 50 bp paired-end sequenziert (System: Illumina cbot v1 und Illumina HiSeq1500, Illumina Inc.; San Diego, USA).

### **3.13.3. Illumina-Sequenzierung für Metataxonomanalyse**

Für die Analyse der Zusammensetzung der Organismen auf den Anoden wurde eine Analyse der 16S rDNA durchgeführt. Hierfür wurde die isolierte DNA (siehe 3.11.5. DNA-Isolierung von der Anode) aus dem Ansatz 2 (Isolate (*Clostridium* sp. I, *Clostridium* sp. II, *Paenibacillus* sp., *E. coli*) und der Laborstamm *G. sulfurreducens* (Barcode)) des Batch- und Durchfluss-Systems verwendet. Die Grundlage der Sequenzierung basiert auf der in 3.13.2. (Illumina-Sequenzierung für Metatranskriptomanalyse) beschriebenen Brückenamplifikation. Vor der Sequenzierung wurde zunächst eine Test-PCR (siehe 3.11.1.) durchgeführt, um die Bindung der Primer (Primer-Paar 3, siehe Tab. 3) zu überprüfen. Die Primer binden spezifisch an die 16S rDNA und somit wird dieser Bereich mit den passenden Adaptoren amplifiziert. Die Amplikons werden auch hier wieder auf die Trägerplatte aufgebracht und es erfolgte eine „paired-end“-Sequenzierung mit 2 x 250 bp (System: MiSeq Next Generation Sequencing, Illumina Inc., San Diego, USA). Diese Sequenzierung wurde von der Firma IMG/M Laboratories GmbH (Martinsried, Deutschland) durchgeführt.

## **3.14. Bioinformatische Auswertung**

### **3.14.1. BLAST**

Für eine erste phylogenetische Einordnung der isolierten Organismen aus den Abwässern wurden die, nach der PCR und Sequenzierung, erhaltenen Sequenzen einer BLAST-Suche (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul *et al.*, 1990) unterzogen. Dort werden die Sequenzen mit öffentlichen Datenbanken verglichen und nahe verwandten Sequenzen und damit bestimmten Organismen zugeordnet. Die isolierten und identifizierten Organismen werden nun in Brennstoffzellen hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Oxidation der im Abwasser befindlichen organischen Säuren und der damit einhergehenden Stromproduktion untersucht.

### **3.14.2. Metatranskriptomdaten**

Die Sequenzrohdaten im FASTQ-Format der Proben des Durchfluss-Experimentes der M3C und der 1. und 6. Adaptationsgeneration von *G. sulfurreducens* in 75% hA-Abwasser wurden zunächst mit dem Programm bowtie2 (Langmead & Salzberg 2012) mit dem Genom von *Geobacter sulfurreducens* PCA

(NCBI-Acc.No. NC\_002939.5) verglichen und anschließend nach ihrer Position auf dem Chromosom mit samtools (Li *et al.*, 2009) sortiert. Die absolute Expression der Gene wurde durch den Vergleich der Read-Positionen mit den annotierten Genloci durch htseq erstellt (Anders *et al.*, 2015), normalisiert und die differentielle Expression (fold changes) berechnet (R Paket DESeq2 (Love *et al.*, 2014)). Für die Identifizierung der verschiedenen Stoffwechselwege der Isolate in den Batch-Versuchen und dem Durchfluss-Experiment, wurde zunächst mit RAPsearch2 (Zhao *et al.*, 2012) ein Alignment, unabhängig mit den reverse und forward Sequenzen, gegen eine Datenbank mit 51 ausgewählten Proteinsequenzen für (Schlüssel-)Enzyme der einzelnen Stoffwechselwege durchgeführt. Die Ergebnisse wurden anschließend auf Treffer mit > 50% Identität und > einer Länge von 9 Aminosäuren (max. Größe: 50 nt = max. 16 AS) gefiltert. Die Treffer wurden für jedes Protein addiert, im Anschluss durch die Gesamtzahl der Treffer dividiert und  $10^6$  für die RPM-Normalisierung (reads per million) multipliziert. Diese Auswertungen wurden von Dr. Andreas Dötsch (MRI, Karlsruhe) durchgeführt.

### 3.14.3. Metataxonomdaten

Die Daten (FastQ-Format) aus der Illumina-Sequenzierung der Firma IMGM wurden mithilfe der CLC Genomics Workbench Software (Version 10.1.1, Quiagen; Venlo, Niederlande) und dem Microbial Genomics Module (Quiagen; Venlo, Niederlande) analysiert. Hierfür wurden zunächst die Primersequenzen von den eigentlichen 16S-Sequenzen entfernt. Im Anschluss wird ein sog. Quality-Trimming durchgeführt, bei dem Sequenzabschnitte >NN entfernt werden und Sequenzen mit niedriger Qualität ( $p = 0,05$ ) entfernt werden. Danach werden die forward und reverse Sequenzen zusammengefügt und alle Sequenzen auf eine Länge gekürzt, um sie vergleichbar zu machen. In einem letzten Schritt kommt es zu dem sog. OTU-Clustering (**O**perational **T**axonomic **U**nit), bei dem alle Sequenzen mit mind. 97% Identität zu einem Cluster zusammengefasst werden: Diese Cluster enthalten Organismen der gleichen Art.

## 3.15. Mikroskopie

### 3.15.1. Bestimmung der Zellzahl

Für die Bestimmung der Zellzahl wurde die Zählkammer Neubauer-improved (Marienfeld; Lauda-Königshofen) mit einer Kammertiefe von 0,01 mm und einer Fläche von  $0,0025 \text{ mm}^2$  verwendet. Für das Auszählen der Zellen wurde eine Kultur verwendet, die so verdünnt wurde, dass pro Großquadrat nicht mehr als 100 Zellen zu zählen waren. Es wurden 11 Großquadrate gezählt und die Zahl gemittelt. Mithilfe der Größenangaben der Kammer (Tiefe 0,01 mm und Fläche

0,0025 mm<sup>2</sup>) konnten die Zellen pro ml berechnet werden. Die Bestimmung der Zellzahl wurde bei 40-facher Vergrößerung im Phasenkontrast mit dem Leica DM750 Lichtmikroskop durchgeführt.

### **3.15.2. Lichtmikroskopie**

Das Mikroskop, welches in dieser Arbeit verwendet wurde, um die Mikroorganismen darzustellen, ist ein Leica Typ DM5500B mit einer DFC360FX Kamera. Dafür wurden ca. 10 µl Bakterienkultur auf einen Objektträger aufgebracht und ein Deckglas daraufgelegt. Mithilfe der Phasenkontrast-Mikroskopie und einem 100 x Objektiv (N PLAN 100 x /1.25 Oil PH 3, Leica) mit Öl Immersion konnten Bilder der Organismen gemacht werden. Die Bilder wurden mit der Leica Software LAS-AF aufgenommen und anschließend auch bearbeitet.

### **3.15.3. Fluoreszenzmikroskopie**

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine Variante der Lichtmikroskopie und beruht auf dem Prinzip bestimmter fluoreszierender Stoffe, den sog. Fluorochromen, die Licht bestimmter Wellenlänge (UV-Licht oder kurzwelliges sichtbares Licht) absorbieren und bei veränderter Wellenlänge (länger welligem Licht) wieder abgeben (Emission). Aus der Lichtquelle trifft zunächst der Lichtstrahl auf einen Anregungsfilter, der nur eine bestimmte Anregungswellenlänge durchlässt. Ein dichroischer Spiegel reflektiert zunächst dieses Licht mit geringerer Wellenlänge, welches dann durch das Objektiv tritt und als konzentrierter Strahl auf das Präparat trifft. Die im Präparat befindlichen Fluoreszenzfarbstoffe werden angeregt und geben Licht mit höherer Wellenlänge ab, welches dann durch den dichroischen Spiegel durchgelassen wird. Ein zusätzlicher Filter (Emissionsfilter) lässt wiederum kein Licht mit höherer Wellenlänge als das des Emissionslichtes durch. Durch diese speziellen Filter am Mikroskop werden Anregungs- und Fluoreszenzlicht so voneinander separiert, dass lediglich die gewünschten Strukturen vor dunklem Hintergrund fluoreszieren. Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe, welche der Tabelle 31 zu entnehmen sind, wurden in dieser Arbeit verwendet, um die verschiedenen Organismen auf den Anoden mittels FISH sichtbar zu machen. Für eine Testfärbung wurden Flüssigkulturen auf den Slides angefärbt (siehe 3.11.11. Fluorescence In Situ Hybridization).

*Tabelle 31: Die in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und die dementsprechenden Filter des Mikroskops.*

<b>Fluoreszenzfarbstoff</b>	<b>Absorptions- max. [nm]</b>	<b>Emissions- max. [nm]</b>	<b>Filter Leica</b>	<b>Intensität</b>
DAPI	358	461	A4	2-4
Cyanin 3 (CY3)	550	568	Y3	2-4
Cyanin 5 (CY5)	647	673	Y5	4-5
Fluoresceinisothiocyanate (FITC)	495	520	L5	4-5

Das Mikroskop, welches für die Fluoreszenzmikroskopie verwendet wurde, ist ebenfalls das Leica Typ DM5500B mit einer DFC360FX Kamera. Für die auf die Slides aufgetragenen Flüssigproben, wurde das 100 x Objektiv (HCX PL Fluorotat 100 x 1,3 Oil, Leica) mit Öl Immersion und für die Anodenstücke wurde ein Dip-In-Objektiv 63 x HCX APO L63/090W mit Wasserimmersion verwendet. Für die Verwendung dieses Dip-In-Objektivs wurden die Anoden in eine Petrischale mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gegeben und konnten so mikroskopiert werden. Die Bilder der Anoden und Flüssigkulturen wurden ebenfalls mit der Leica Software LAS-AF aufgenommen und anschließend mit diesem Programm bearbeitet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Isolierungskampagnen aus den verschiedenen Abwässern

Wie bereits in 3.1. (Isolierungskampagnen und Kulturmedien von potentiell exoelektrogenen Mikroorganismen aus den verschiedenen Abwässern) beschrieben, wurden die Mikroorganismen mithilfe einer Verdünnungsreihe ( $10^{-1}$ -Verdünnung bis  $10^{-8}$ -Verdünnung) und darauffolgenden Vereinzlungsausstichen aus dem kommunalen Abwasser der Emschergenossenschaft und dem industriellen Abwasser der Firma Solvay isoliert.  $\text{Fe}^{3+}$ -reduzierende Organismen konnten auf dem  $\text{Fe}^{3+}$ -Citrat-Agar leicht identifiziert werden, da um die Kolonie herum ein farbloser Hof entsteht (Reduktion von  $\text{Fe}^{3+}$  zu  $\text{Fe}^{2+}$ , welches farblos ist), sobald die Organismen zur  $\text{Fe}^{3+}$ -Reduktion befähigt sind. In den folgenden Tabellen (Tab. 32 und 33) sind die isolierten Mikroorganismen aufgelistet. Für die Identifizierung der Organismen wurde zunächst ein Alignment der beiden erhaltenen Sequenzen (jeweils mit forward und reverse Primern sequenziert) durchgeführt und die paarweise identischen Bereiche für eine phylogenetische Einordnung der BLAST-Suche unterzogen.

Aus dem Abwasser der Emschergenossenschaft konnten sechs verschiedene Mikroorganismen isoliert werden: *Bacteroides* sp. mit 100% Ähnlichkeit zu *Bacteroides graminisolvens*, *Clostridium* sp. mit 100% Ähnlichkeit zu *Clostridium beijernickii*, *E. coli* mit 99% Ähnlichkeit zu *E. coli* S5-6, *Enterococcus* sp. mit 99% Ähnlichkeit zu *Enterococcus faecium*, *Romboutsia* sp. mit 99% Ähnlichkeit zu *Romboutsia lituseburensis* und *Shewanella* sp. mit 99% Ähnlichkeit zu *Shewanella putrefaciens*.

Tabelle 32: Isolierte Mikroorganismen aus dem Abwasser der Emschergenossenschaft (Em).

Stamm	phylogenetische Einordnung <sup>a</sup>	Übereinstimmung % (Identity) <sup>a</sup>	Alignment Länge (bp) <sup>b</sup>	Alignment Ähnlichkeit (%) <sup>b</sup>
Em 1	<i>Bacteroides graminisolvens</i>	100	1370	99,6
Em 2	<i>Clostridium beijernickii</i>	100	1344	99,4
Em 3	<i>Escherichia coli</i>	99	1404	99,6
Em 4	<i>Enterococcus</i>	99	1400	99,1

<i>faecium</i>				
Em 5	<i>Romboutsia lituseburensis</i>	99	1350	100
Em 6	<i>Shewanella putrefaciens</i>	99	1370	99,8

<sup>a</sup> Ergebnisse der phylogenetischen Einordnung über die BLAST-Suche mit der Übereinstimmung (%) zu bereits in der Datenbank vorhandenen Sequenzen.

<sup>b</sup> Alignment der beiden Sequenzen des forward und reverse Primers mit der Länge des Alignments (bp) und der paarweisen Ähnlichkeit der forward und reverse Sequenz (%) (Programm: Geneious).

Aus dem Abwasser, welches hinter dem Absetzzyklon der Firma Solvay entnommen wurde, konnten zwei der vier Mikroorganismen isoliert: *Clostridium* sp. II mit 99% Ähnlichkeit zu *Clostridium butyricum* und *Paenibacillus* sp. mit 99% Ähnlichkeit zu *Paenibacillus phoenicis*. Aus dem Abwasser der Grobdosierung wurden *Clostridium* sp. I mit 99% Ähnlichkeit zu *Clostridium sartagoforme* und *E. coli* mit 99% Ähnlichkeit zu *E. coli* PMV-1 isoliert.

Tabelle 33: Isolierte Mikroorganismen aus dem Abwasser der Firma Solvay (So).

Stamm	phylogenetische Einordnung <sup>a</sup>	Übereinstimmung % (Identity) <sup>a</sup>	Alignment Länge (bp) <sup>b</sup>	Alignment Ähnlichkeit (%) <sup>b</sup>
So 1 <sup>d</sup>	<i>Clostridium sartagoforme</i>	99	1357	99,9
So 2 <sup>c</sup>	<i>Clostridium butyricum</i>	99	1379	99,9
So 3 <sup>d</sup>	<i>Escherichia coli</i>	99	1389	99,1
So 4 <sup>c</sup>	<i>Paenibacillus phoenicis</i>	99	1371	99,9

<sup>a</sup> Ergebnisse der phylogenetischen Einordnung über die BLAST-Suche mit der Übereinstimmung (%) zu bereits in der Datenbank vorhandenen Sequenzen.

<sup>b</sup> Alignment der beiden Sequenzen des forward und reverse Primers mit der Länge des Alignments (bp) und der paarweisen Ähnlichkeit der forward und reverse Sequenz (%) (Programm: Geneious).

<sup>c</sup> Aus dem Abwasser von hinter dem Absetzzyklon isolierte Mikroorganismen.

<sup>d</sup> Aus dem Abwasser der Grobdosierung isolierte Mikroorganismen.

Alle isolierten Mikroorganismen wurden im Anschluss mikroskopiert und es wurden Kryokulturen für weitere Versuche hergestellt. Die Aufnahmen sind den Abbildungen 16 und 17 zu entnehmen.

*Bacteroides* sp. hat die Form von kleinen, gedrungenen Stäbchen, die fast rundlich erscheinen und beweglich sind. Das Bakterium hat eine Länge von ca. 2 - 4  $\mu\text{m}$  und eine Breite von ca. 1  $\mu\text{m}$  (Abbildung 16 A). Die Zellen von *Clostridium* sp. haben ebenfalls eine Stäbchenform, welche mit einer Länge von 6 – 20  $\mu\text{m}$  deutlich länger sind, als die von *Bacteroides* sp.. Die Breite ist ca. 2  $\mu\text{m}$  und der Organismus bildet mittige und endständige Sporen (Abbildung 16 B). *E. coli* bildet ebenfalls Stäbchen aus mit einer Länge von ca. 2 – 5  $\mu\text{m}$  und eine Breite von ca. 1  $\mu\text{m}$ . Die Zellen sind ebenfalls beweglich (Abbildung 16 C). *Enterococcus* sp. bildet sog. Kettenkokken, in denen 2 bis max. 7 Zellen aneinanderhängen. Die einzelnen Kokken haben einen Durchmesser von ca. 2,5  $\mu\text{m}$  (Abbildung 16 D). Die Zellen von *Romboutsia* sp. sind stäbchenförmig und bilden endständige Sporen aus. Die Länge beträgt ca. 8 – 10  $\mu\text{m}$  und die Breite ca. 3  $\mu\text{m}$  (Abbildung 16 E). *Shewanella* sp. bildet ebenfalls Stäbchen aus, welche eine Länge von ca. 3 – 9  $\mu\text{m}$  und eine Breite von ca. 1,5  $\mu\text{m}$  aufweisen. Die Zellen sind länger und dünner, als die von *E. coli* und sind ebenfalls beweglich (Abbildung 16 F). Mit den Isolaten der Emschergenossenschaft wurde in dieser Arbeit nicht weitergearbeitet. Sie sind Bestandteil der Doktorarbeit von Frederik Golitsch (Golitsch, 2016).

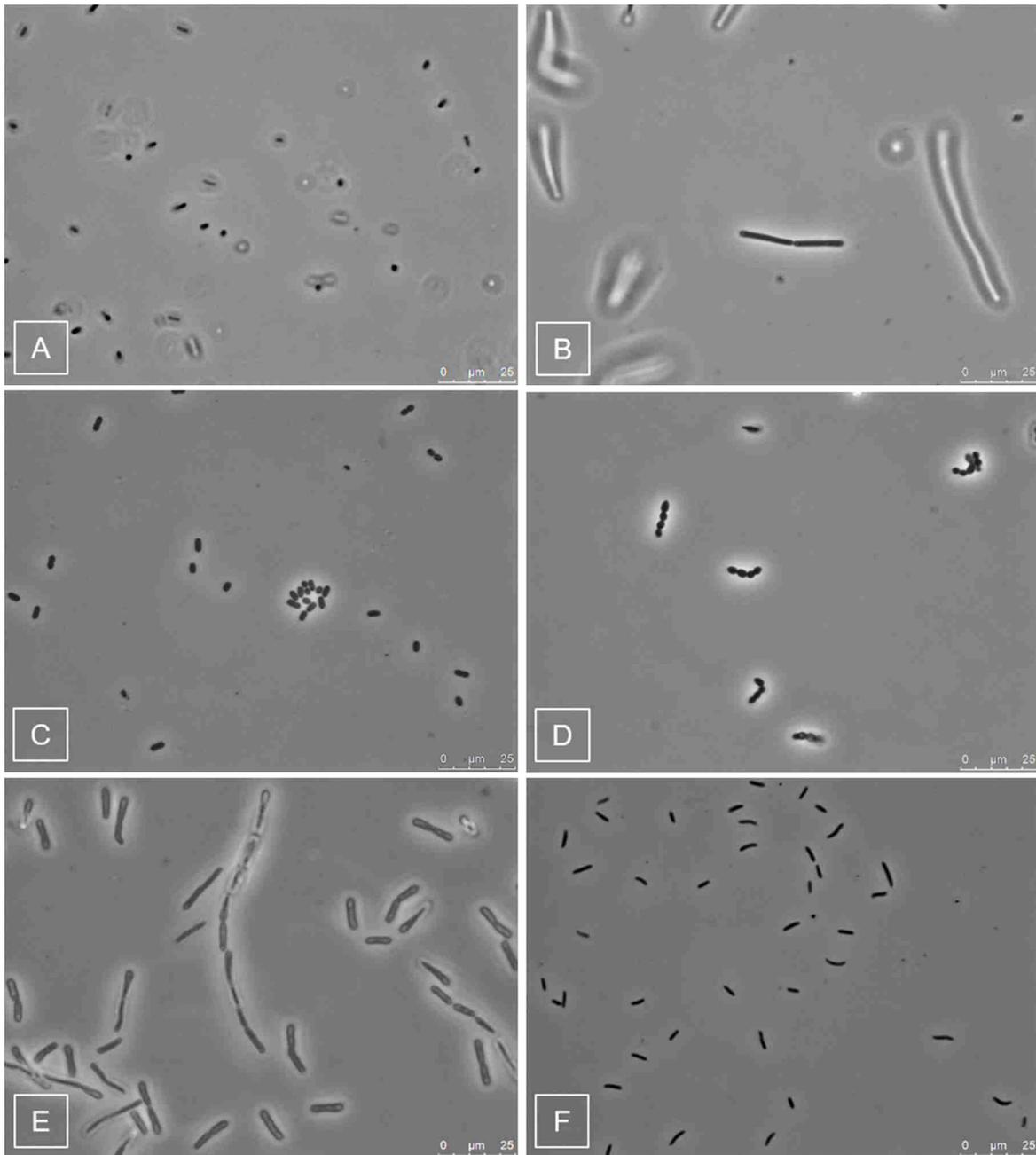


Abbildung 16: Isolate aus dem Abwasser der Emschergerossenschaft. A) *Bacteroides* sp., B) *Clostridium* sp., C) *E. coli*, D) *Enterococcus* sp., E) *Romboutsia* sp. und F) *Shewanella* sp.. Phasenkontrastmikroskopie mit 100 x Vergrößerung und Öl-Immersion. Größenbalken 25 µm.

*Clostridium* sp. I ist ein stäbchenförmiges Bakterium mit endständigen Sporen. Es hat eine Länge von ca. 5 - 16 µm und einer Breite von ca. 1 - 2 µm (Abbildung 17 A). Die Zellen von *Clostridium* sp. II hingegen sind mit einer Breite von 2 - 2,5 µm etwas breiter, zeigen jedoch ebenfalls eine Länge von ca. 6 - 20 µm. Der Organismus ist beweglich und bildet endständige Sporen. Die Spore selbst hat eine Länge von ca. 10 µm, einer Breite von ca. 4 µm und ist leicht tropfenförmig (Abbildung 17 B). *E. coli* bildet ebenfalls Stäbchen aus mit einer Länge von ca. 2 - 4 µm und einem Durchmesser von ca. 1 µm. Die Zellen sind beweglich (Abbildung 16 C). *Paenibacillus* sp. zeigt das gleiche Erscheinungsbild, wie *Clostridium* sp. I,

jedoch sind die Zellen mit einer Länge von 4 – 10  $\mu\text{m}$  deutlich kleiner. Die Breite ist ca. 1  $\mu\text{m}$  und der Organismus bildet endständige Sporen aus.

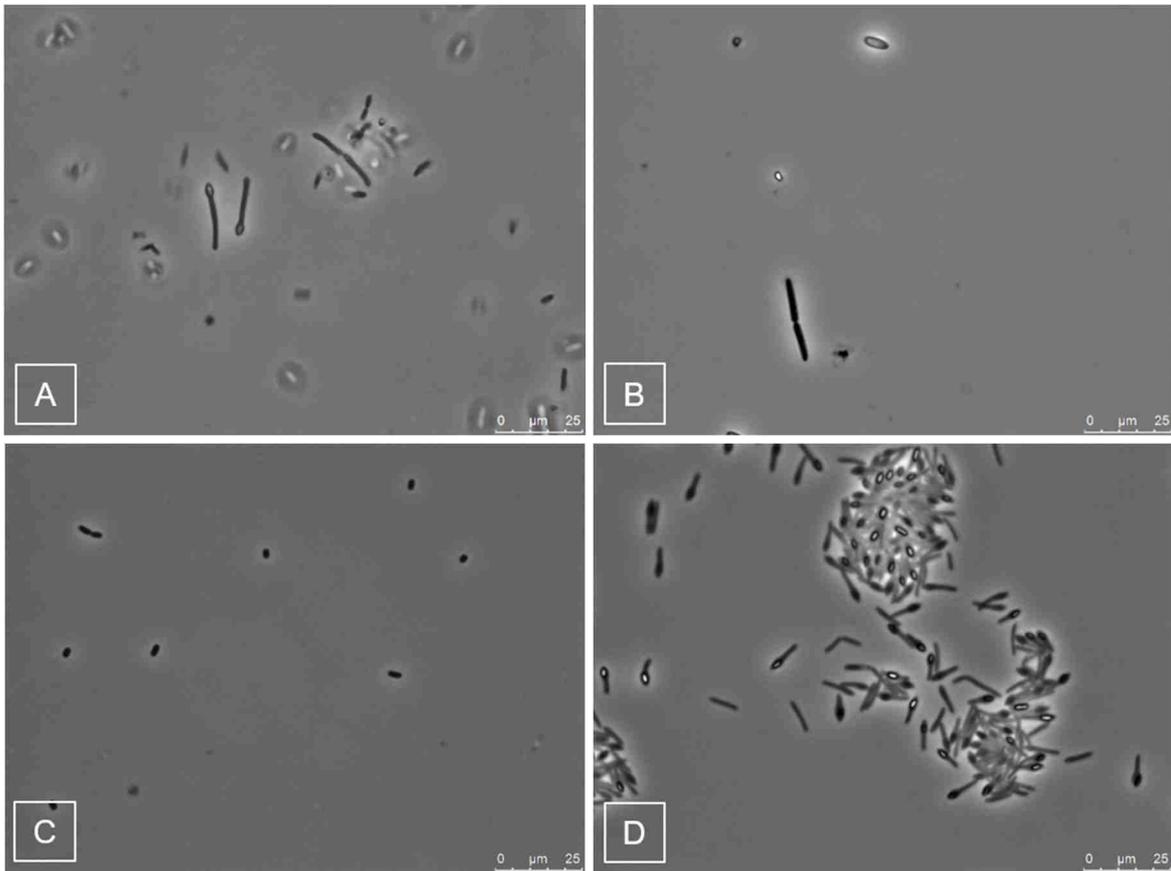


Abbildung 17: Isolate aus dem Abwasser von hinter dem Absetzzyklon und der Grobdosierung der Firma Solvay. A) *Clostridium* sp. I, B) *Clostridium* sp. II, C) *E. coli*, D) *Paenibacillus* sp.. Phasenkontrastmikroskopie mit 100 x Vergrößerung und Öl-Immersion. Größenbalken 25  $\mu\text{m}$ .

Für alle weiteren Versuche wurden die Organismen *Clostridium* sp. I, *Clostridium* sp. II, *E. coli* und *Paenibacillus* sp. verwendet.

## 4.2. Analyse des hA-Abwassers der Firma Solvay

Zu Beginn der Arbeit wurde das Abwasser auf seine Zusammensetzung hin untersucht. Dafür wurde die Konzentration an Acetat, Phosphat, Nitrat, Nitrit und Ammonium gemessen und der TOC und TN bestimmt. Zudem wurde die Leitfähigkeit des Abwassers bestimmt (siehe 3.12. Analytische Methoden).

#### 4.2.1. Bestimmung der Phosphat-, Nitrat-, Nitrit- und Ammoniumkonzentration

Die Bestimmung der Phosphat-, Nitrat-, Nitrit- und Ammoniumkonzentration wurde einmalig zu Beginn dieser Arbeit durchgeführt, wobei die Phosphatkonzentration über die IC ermittelt und eine Konzentration von 41 mM im hA-Abwasser gemessen wurde. Für die Messung der Nitrat-, Nitrit- und Ammoniumkonzentration wurden die Hach-Lange Küvetten-Tests verwendet, welche eine Konzentration von 17,62 mM für Ammonium, 0,3 mM für Nitrat und 0 mM für Nitrit ergaben (siehe Tab. 34).

*Tabelle 34: Gemessene Konzentrationen [mM] von Ammonium, Nitrat und Nitrit im hA-Abwasser.*

Verbindung	Konzentration in mM	verwendete Analyse
Phosphat	41	IC
Ammonium	17,62	Hach-Lange
Nitrat	0,3	Hach-Lange
Nitrit	0	Hach-Lange

#### 4.2.2. Bestimmung der Acetatkonzentration, des TOC und TN

Die Messung der Acetatkonzentration, des TOC und TN wurde über einen Zeitraum von zwei Jahren regelmäßig durchgeführt, um zu beobachten, ob diese konstant blieben oder sich, abhängig von der Jahreszeit oder anderen Faktoren, veränderten. Die Acetatkonzentration wurde über die HPLC ermittelt, der TOC und TN über den TOC-Analysator. Der folgenden Tabelle (siehe Tab. 35) sind die Werte über die Zeit zu entnehmen.

*Tabelle 35: Gemessene Acetatkonzentration [mM], TOC [g/L] und TN [g/L] von April 2014 bis März 2016 unter Angabe des Mittelwertes der einzelnen Parameter.*

Zeitpunkt	Acetatkonzentration in mM	TOC in g/L	TN in mg/L
April 2014	43,2	2,14	592,8
Oktober 2014	57,1	2,14	512,9
März 2015	45,7	1,93	523,3
Juni 2015	40,03	1,6	541,4
März 2016	50,0	2,13	451,51
Mittelwert	47,2	1,99	524,38

Der Tabelle 35 ist zu entnehmen, dass sich für die Acetatkonzentration im Laufe der 2 Jahre ein durchschnittlicher Wert von 47,2 mM ergab. Die Werte schwankten zwischen den einzelnen Zeitpunkten der Probenentnahme um max. 29,89%. Für den gemessenen TOC ergab sich ein durchschnittlicher Wert von 1,99 g/L, was einem maximalen Unterschied zwischen den einzelnen Werten von 25,23% entsprach. Bei der Berechnung des TN ergab sich ein Durchschnittswert von 524,38 mg/L und einer maximale Schwankung von 23,83% über den kompletten Messzeitraum. Ausgehend der errechneten Mittelwerte für Acetat und den TOC entsprachen 56,93% des Gesamt-TOC der Menge an Acetat.

#### 4.2.3. Bestimmung der Leitfähigkeit und des pH-Wertes

Die gemessene Leitfähigkeit des Abwassers betrug 6,5 mS und der pH-Wert lag bei ca. 7,5 bis 8,1.

### 4.3. Fe<sup>3+</sup>-Reduktion der Isolate

Nach der Identifizierung der Mikroorganismen, welche aus dem Solvay-Abwasser isoliert wurden, wurde zunächst ein Ferrozine-Assay durchgeführt. Hier sollte die Fähigkeit zur Fe<sup>3+</sup>-Reduktion der vier Isolate untersucht werden. In Abbildung 18 ist die Fe<sup>2+</sup>-Konzentration über die Zeit aufgetragen. Die untere x-Achse ist den Isolaten *Clostridium* sp. I, *Clostridium* sp. II und *Paenibacillus* sp. zuzuordnen und die obere *E. coli*. *Clostridium* sp. I zeigte dabei die größte Fe<sup>3+</sup>-Reduktion mit 38,9 mM innerhalb von 24 h (—). *Paenibacillus* sp. reduzierte innerhalb von 24 h 30,3 mM Fe<sup>3+</sup> (—) und *Clostridium* sp. II lediglich 13,3 mM Fe<sup>3+</sup> (—). *E. coli* zeigte eine sehr geringe Reduktion von Fe<sup>3+</sup> in dem Medium ohne Zugabe von Glukose: innerhalb von 24 h reduzierte der Organismus ca. 3 mM Fe<sup>3+</sup> und nach etwa 12 Tagen konnten 17,9 mM Fe<sup>2+</sup> nachgewiesen werden (—). Somit konnte für alle Isolate die Fähigkeit zur Fe<sup>3+</sup>-Reduktion aufgezeigt werden.

Abbildung 18:  $Fe^{3+}$ -Reduktion der Isolate. Aufgetragen ist hier die  $Fe^{2+}$ -Konzentration in mM über die Zeit in h. Der Ferrozine-Assay zeigt die Fähigkeit der Isolate  $Fe^{3+}$  zu reduzieren. Die untere x-Achse ist den Isolaten *Clostridium sp. I*, *Clostridium sp. II* und *Paenibacillus sp.* zuzuordnen und die obere *E. coli*. *Clostridium sp. I* (—), *Paenibacillus sp.* (—), *Clostridium sp. II* (—) und *E. coli* (—). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Triplikates.

#### 4.4. Wachstumsversuche mit *Clostridium sp. I*

Aufgrund der hohen Reduktion von  $Fe^{3+}$ , die der Stamm in dem Reduktions-Assay gezeigt hatte, wurden weitere Wachstumsversuche mit dem Organismus durchgeführt. Zum einen wurden Wachstumsversuche in Schottflaschen (3.7. Wachstumsversuche mit *Clostridium sp. I*) und zum anderen in einer mikrobiellen Brennstoffzelle (M3C) durchgeführt (3.10. M3C-System mit definiertem Medium).

#### 4.4.1. Wachstumsversuche in Schottflaschen

In diesen Wachstumsversuchen wurden zwei verschiedene Ansätze miteinander verglichen:

- (1) Respirations-Versuch zur Untersuchung der  $\text{Fe}^{3+}$ -Reduktion & Umsetzung der im Medium enthaltenen Glukose zu organischen Säuren
- (2) Gärungs-Versuch zur Untersuchung der Umsetzung der im Medium enthaltenen Glukose zu organischen Säuren

In Abbildung 19 ist das Wachstum des Stammes über die Zeit und die Reduktion von  $\text{Fe}^{3+}$  des Respirationsversuchs dargestellt. Es ist deutlich erkennbar, dass das Wachstum der Kultur, in der  $\text{Fe}^{3+}$  dem Medium zugegeben wurde (—), in der Anfangs-Phase ein schnelleres Wachstum zeigte und auch eine höhere optische Dichte erreichte. Mit einer  $\text{OD}_{655} = 3,3$  nach 12,5 h im Vergleich zu  $\text{OD}_{600} = 1,41$  innerhalb von 13 h ohne  $\text{Fe}^{3+}$  im Medium (—) konnte die Zellausbeute mehr als verdoppelt werden. Schon bereits nach 2 Stunden war in der Kultur mit  $\text{Fe(III)}$  fast eine Verdopplung der  $\text{OD}_{655}$  erreicht ( $\text{OD}_{655} = 0,049$  auf  $\text{OD}_{655} = 0,087$ ). Zudem wurden innerhalb von 12,5 h 38,03 mM  $\text{Fe}^{3+}$  reduziert (----). Nach 24 h konnten 39,4 mM  $\text{Fe}^{3+}$  reduziert werden. Zu diesem Zeitpunkt war die  $\text{OD}_{655}$  bereits niedriger und lag bei 1,70. Die Zellen befanden sich in der Absterbe-Phase. Die Reduktion von  $\text{Fe}^{3+}$  fand während der log-Phase des Stammes statt, welche schon nach 3 h eintrat. In dem Gärungsversuch zeigte sich eine lange initiale lag-Phase und erst nach 5 h ein Wachstum der Zellen. Nach 7 h startete die log-Phase der Kultur. Innerhalb von 24 h war eine  $\text{OD}_{600} = 1,74$  erreicht und nach 26 h sank diese schon wieder auf  $\text{OD}_{600} = 1,67$ . Die errechnete Verdopplungszeit  $t_d$  des Organismus im Respirationsversuch ist mit 35,5 min ( $\mu = 0,0195/\text{min}$ ) halb so hoch, wie in dem Gärungsversuch mit 71,1 min ( $\mu = 0,0097/\text{min}$ ). Der Tabelle 36 sind die Wachstumsraten  $\mu$  und Verdopplungszeiten  $t_d$  der beiden Versuche zu entnehmen.

Abbildung 19: Wachstum und  $Fe^{3+}$ -Reduktion von *Clostridium sp. I*. Aufgetragen ist hier das Wachstum ( $OD_{600}/OD_{655}$ ) unter Gärungsbedingungen und Respirationsbedingungen (Zugabe von  $Fe^{3+}$ -Citrat zum Medium) und die korrelierende  $Fe^{2+}$ -Konzentration in mM über die Zeit in h. Gärungsversuch (—), Respirationsversuch (—) und  $Fe^{2+}$ -Konzentration (---). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Triplikates.

Tabelle 36: Wachstumsrate  $\mu$  und Verdopplungszeit  $t_d$  von *Clostridium sp. I* unter Respirations- und Gärungsbedingungen.

Versuch	Wachstumsrate $\mu$ in $\text{min}^{-1}$	Verdopplungszeit $t_d$ in min
Respiration	0,0195	35,5
Gärung	0,0097	71,1

Der Abbildung 20 ist das Edukt- und Produktspektrum und die gemessene OD des Gärungs- und Respirationsversuchs zu entnehmen. In dem Medium ohne  $Fe^{3+}$  (Abb. 20 A) wurden innerhalb von 13 h 21,33 mM Glukose (■) abgebaut und 8,9 mM Acetat (■) und 6,10 mM Butyrat (■) produziert. Nach 26 h waren 28 mM Glukose abgebaut und 7,71 mM Butyrat produziert, die Acetatkonzentration hat sich nicht weiter gesteigert. Wie bereits beschrieben, ist die  $OD_{600}$  von 0,05 (0 h) auf 1,4 innerhalb von 13 h gestiegen. Nach 26 h lag diese bei 1,67 (■). In dem Medium mit zugegebenem  $Fe^{3+}$  (Abb. 20 B) war zu sehen, dass innerhalb von 12,5 h mit 35,92 mM deutlich mehr Glukose (■) verbraucht wurde, als in dem Gärungsversuch. Dabei wurden 16,74 mM Acetat (■) und 8,85 mM Butyrat (■)

produziert. Nach 24 h waren lediglich 0,44 mM Glukose messbar, was bedeutet, dass die gesamte Glukose (51,30 mM) von *Clostridium* sp. I metabolisiert wurde. In dieser Zeit entstanden 22,20 mM Acetat und 9,44 mM Butyrat. Die Acetatausbeute im Respirationsversuch ist damit 2,5 x mehr als im Gärungsversuch. Zudem wurde 1,8 x mehr Glukose abgebaut, wenn  $\text{Fe}^{3+}$  im Medium vorhanden war. Die produzierte Butyratkonzentration war im Respirationsversuch um ca. 2 mM höher als im Gärungsversuch. Auch die  $\text{OD}_{655}$ , welche im Wachstumsversuch erreicht wurde, ist, wie zuvor erwähnt, mit 3,3 nach 12,5 h deutlich höher (■). Nach 24 h war die optische Dichte mit einem Wert von 1,7 bereits wieder niedriger.

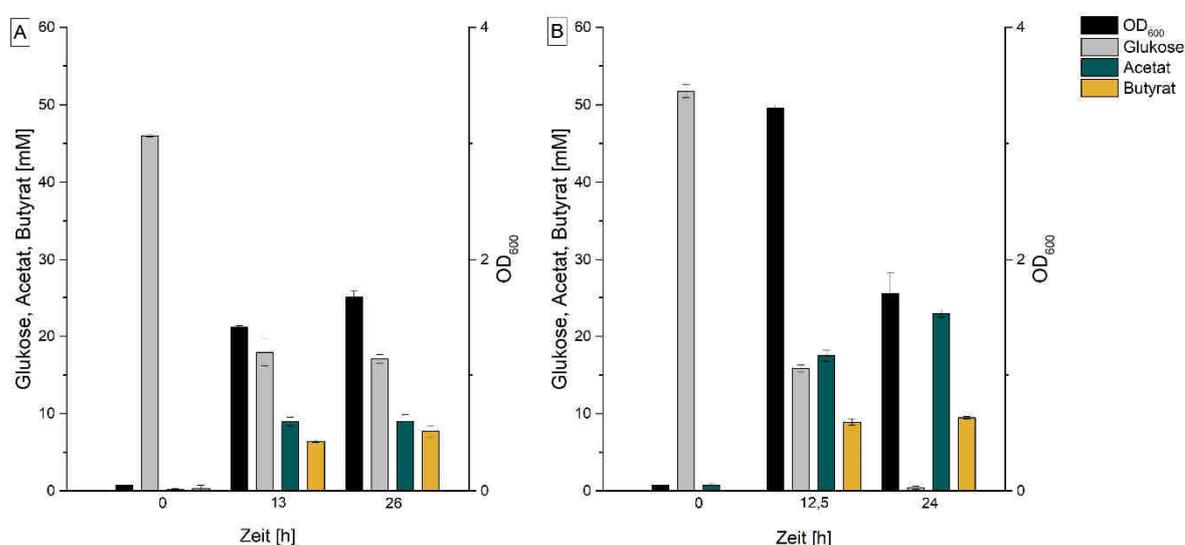


Abbildung 20:  $\text{OD}_{600}$ , Edukt- und Produktspektrum von *Clostridium* sp. I im Wachstumsversuch. Aufgetragen wurde die gemessene  $\text{OD}_{600}$  (■), die Menge an Glukose (■), Acetat (■) und Butyrat (■) zum Zeitpunkt 0 h, 12,5 h bzw. 13 h und nach 24 h bzw. 26 h. A) Gärungsversuch. B) Respirationsversuch. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Triplikates.

In Tabelle 37 ist die Ausbeute von Acetat und Butyrat pro mol Glukose angegeben. In dem Gärungsversuch entstand pro mol Glukose 0,31 mol Acetat und 0,28 mol Butyrat. In dem Versuch mit  $\text{Fe}^{3+}$ -Citrat als zusätzlichem Elektronendonator entstanden hingegen 0,43 mol Acetat, aber nur 0,18 mol Butyrat pro mol Glukose. Somit ist das Produktspektrum im Gärungsversuch zwischen Butyrat und Acetat recht ausgeglichen, im Respirationsversuch hingegen verschiebt es sich deutlich Richtung Acetat und es wurde weniger Butyrat produziert. Die Kohlenstoffbilanz dieses Versuchs ist in dieser Arbeit nicht zu schließen, da im Gärungsversuch lediglich 38,80% des Kohlenstoffs aus der Glukose in Acetat und Butyrat wiedergefunden werden konnten und im Respirationsversuch 37,06%. Die restlichen, aus dem Metabolismus von

*Clostridium* sp. I entstandenen Produkte konnten innerhalb dieser Arbeit nicht identifiziert werden. Diese Werte sind bezogen auf die Ergebnisse nach 26 h des Gärungs- und 24 h des Respirationsversuchs (siehe Abb. 20).

#### 4.4.2. Wachstumsversuch in einer M3C

In diesem Versuch sollte die elektrochemische Fähigkeit von *Clostridium* sp. I und damit die Interaktion des Organismus mit einer Anode untersucht werden. Bei einem angelegten Potential von  $-0,199$  V vs. Ag/AgCl konnte jedoch keine Stromproduktion festgestellt werden (siehe Abb. 21 A). Zu Beginn des Versuchs, stieg die Stromdichte bis auf ca.  $3,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  an, fiel aber nach etwa 5 h wieder ab, bis sie auf 0 sank und sich für die weiteren 24 h auf diesem Wert einpendelte. Die angeschlossene pH-Kontrolle hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Leistung des Stammes bezüglich der Interaktion mit einer Anode im Vergleich zu den beiden anderen Replikaten.

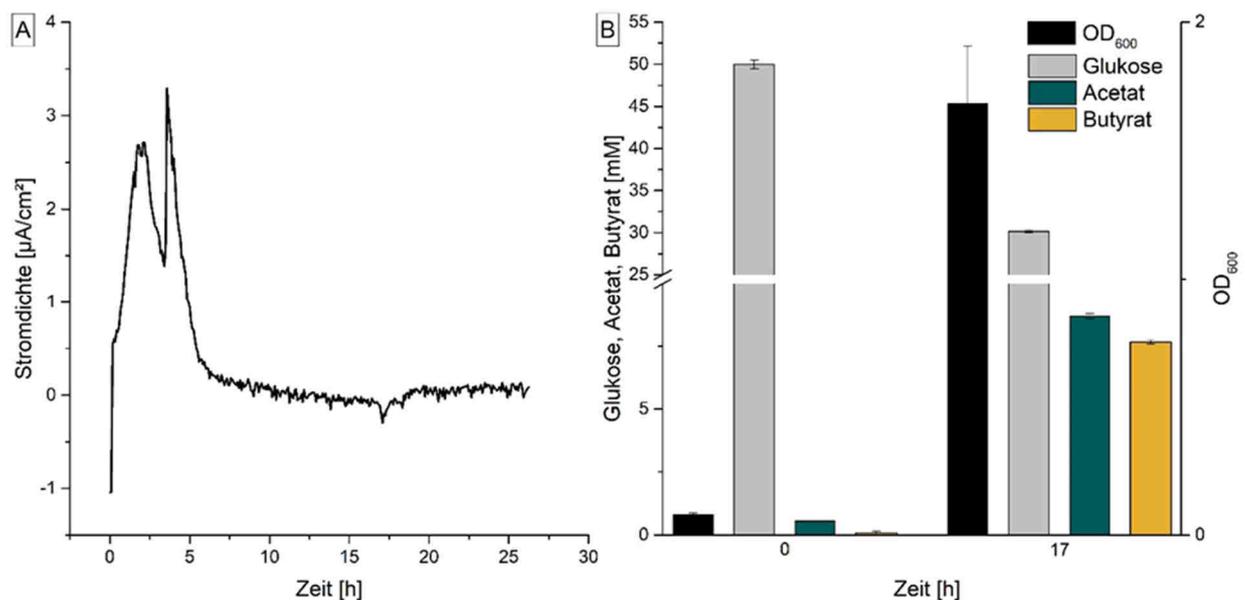


Abbildung 21: Produzierte Stromdichte,  $\text{OD}_{600}$  und Edukt- und Produktspektrum von *Clostridium* sp. I in der M3C. A) Der Graph zeigt die gemessene Stromdichte in  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  über die Zeit in h als Mittelwert der Triplikate. B) Aufgetragen wurde die gemessene  $\text{OD}_{600}$  (■), die Menge an Glukose (■), Acetat (■) und Butyrat (■) zum Zeitpunkt 0 h und nach 17 h. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Triplikates.

Während der Untersuchung zur elektrochemischen Aktivität von *Clostridium* sp. I wurden innerhalb von 17 h 19,83 mM Glukose (■) verstoffwechselt, wobei 8,12 Acetat mM (■) und 7,59 mM Butyrat (■) entstanden sind. Die  $\text{OD}_{600}$  ist in dieser Zeit von 0,08 auf 1,68 angestiegen (■) (siehe Abb. 21 B). Diese Werte sind in

etwa vergleichbar mit den Werten aus dem Gärungsversuch. Dies wird ebenfalls deutlich, wenn man die Produktausbeute (siehe Tab. 37) betrachtet. In diesem Versuch ist das Produktspektrum zwischen Butyrat und Acetat relativ ähnlich, wie in dem Gärungs-Versuch. Pro mol Glukose wurden 0,38 mol Butyrat produziert und 0,4 mol Acetat. Auch hier kann die Kohlenstoffbilanz nicht geschlossen werden. Lediglich 52,37% des Kohlenstoffs aus der Glukose wurde in Acetat und Butyrat wiedergefunden.

Tabelle 37: Acetat- und Butyratausbeute pro mol Glukose im Gärungs-, Respiationsversuch und in der M3C.

Produkt	mol Produkt pro mol Glukose	mol Produkt pro mol Glukose	mol Produkt pro mol Glukose
	Gärung	Respiration	M3C
Acetat	0,31	0,43	0,4
Butyrat	0,28	0,18	0,38

## 4.5. Wachstumsversuche mit *G. sulfurreducens* in hA-Abwasser

Aufgrund der Verwendung des Laborstammes *G. sulfurreducens* zur Aufreinigung des hA-Abwassers wurden drei verschiedene Versuche durchgeführt. In einem ersten Versuch wurde das Wachstumsverhalten unter verschiedenen Abwasserkonzentrationen getestet. Im Anschluss wurde die Adaptationsfähigkeit des Stammes in 75% hA untersucht und ob eventuelle Störstoffe, wie Phosphat oder Ammonium im Abwasser das Wachstum des Organismus beeinflussen.

### 4.5.1. Wachstum mit verschiedenen Abwasserkonzentrationen

Abbildung 22 zeigt das Wachstum mit 100% hA, 75% hA, 50% hA, 25% hA und als Kontrolle in *Geobacter*-Medium. Der Tabelle 38 sind die Wachstumsraten  $\mu$  und die Verdopplungszeiten  $t_d$  unter den beschriebenen Bedingungen zu entnehmen. Das Wachstum in *Geobacter*-Medium als Kontrolle zeigte eine max. erreichte  $OD_{600}$  von 0,93 (—). Aus den Werten der Wachstumskurve lässt sich die Wachstumsrate  $\mu = 0,0023/\text{min}$  und eine Verdopplungszeit von 4,9 h errechnen. Im Vergleich dazu ist deutlich zu erkennen, dass der Organismus mit reinem hA-Abwasser (—) nicht in der Lage war, zu wachsen (errechneten Verdopplungszeit  $t_d = 71$  h, Wachstumsrate  $\mu = 0,00016/\text{min}$ ). Die max. erreichte  $OD_{600}$  betrug 0,137 nach 22 h. Bei einer Konzentration von 75% hA zeigte sich eine max. erreichte  $OD_{600} = 0,385$  nach 119,5 h (—), eine Wachstumsrate  $\mu$  von 0,00055/min und eine

Verdopplungszeit  $t_d$  von 20,9 h. Bei geringeren hA-Konzentrationen von 50% und 25% wurden max.  $OD_{600}$  von 0,837 in 49 h (—) und 1,19 (—) in 31 h erreicht. Die dazugehörigen Wachstumsraten und Verdopplungsraten liegen bei  $\mu = 0,0013/\text{min}$ ,  $t_d = 8,6$  h (50% hA) und  $\mu = 0,0016/\text{min}$ ,  $t_d = 7,2$  h (25% hA). Somit wird deutlich, dass je höher die hA-Konzentration ist, desto schlechter ist das Wachstum des Laborstammes. In 25% hA wuchsen die Zellen annähernd so schnell, wie in dem *Geobacter*-Medium. Trotz allem zeigt der Versuch, dass das Abwasser den Stamm in seinem Wachstum einschränkte.

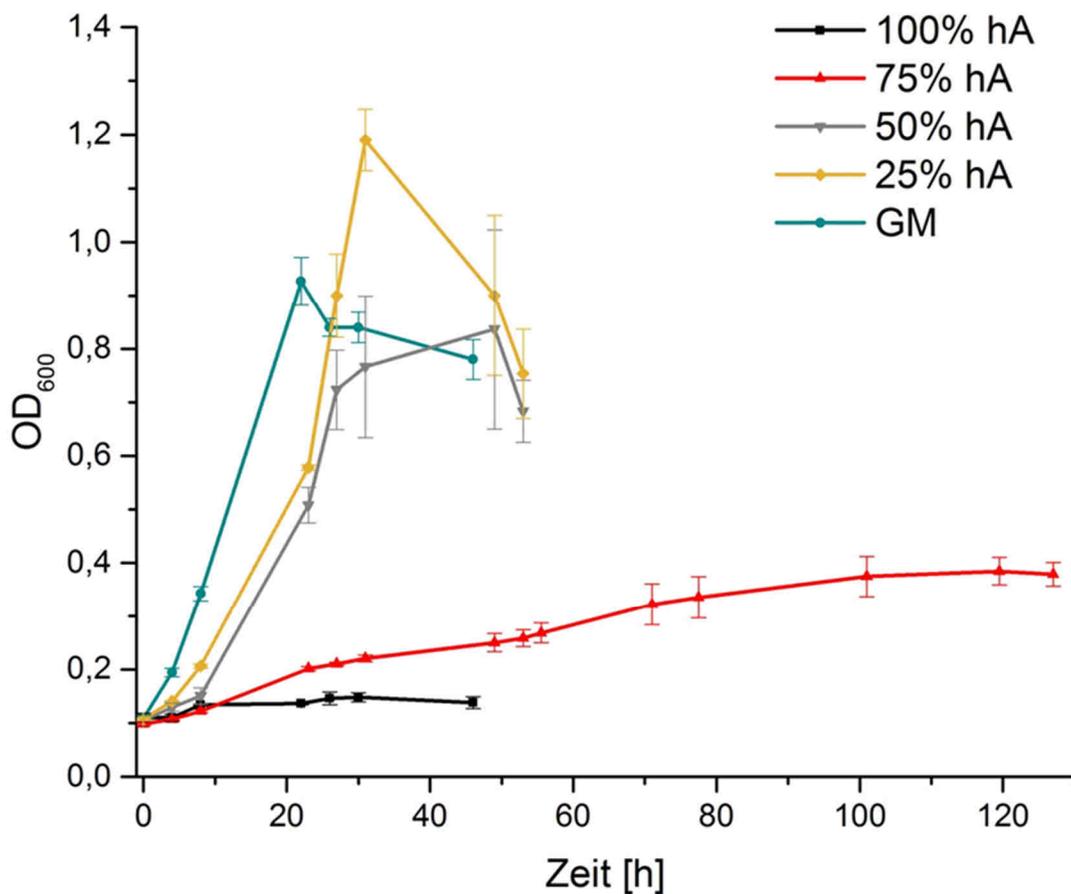


Abbildung 22: Wachstumsverhalten von *G. sulfurreducens* bei verschiedenen hA-Konzentrationen. Dargestellt ist die gemessene  $OD_{600}$  über die Zeit in h in 100% hA (—), 75% hA (—), 50% hA (—), 25% hA (—) und in *Geobacter*-Medium (—). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Triplikates.

Tabelle 38: Wachstumsrate  $\mu$  und Verdopplungszeit  $t_d$  von *G. sulfurreducens* bei verschiedenen hA-Konzentrationen.

Konzentration hA in % / GM	Wachstumsrate $\mu$ in $\text{min}^{-1}$	Verdopplungszeit $t_d$ in h
100	0,00016	71,9
75	0,00055	20,9
50	0,0013	8,6
25	0,0016	7,2
GM	0,0023	4,9

Aufgrund der dargestellten Ergebnisse, die zeigen, dass der Organismus bei einer Konzentration von 75% hA noch in der Lage war zu wachsen, wurde ein Adaptationsversuch durchgeführt.

#### 4.5.2. Adaptation in 75% hA

In diesem Versuch wurde der Organismus hinsichtlich der Adaptation an das Abwasser (75%) über fünf aufeinanderfolgende Adaptationsgenerationen untersucht. Dafür wurde das Wachstum der Kulturen miteinander verglichen. Abbildung 23 zeigt das Wachstum der Adaptationsgenerationen. In Tabelle 39 sind die Wachstumsraten  $\mu$  und die Verdopplungszeiten  $t_d$  aufgelistet. In der 1. Adaptationsgeneration erreichte der Organismus, wie bereits erwähnt eine maximale  $OD_{600} = 0,385$  nach 119,5 h (—), eine Wachstumsrate  $\mu$  von 0,00055/min und eine Verdopplungszeit  $t_d$  von 20,9 h. Im Vergleich dazu, ist zu beobachten, dass der Stamm der 2. Adaptationsgeneration mit einer max. erreichten  $OD_{600} = 0,283$  nach 147 h (—), einer Wachstumsrate  $\mu$  von 0,00013/min und eine Verdopplungszeit  $t_d$  von 88,0 h ein deutlich schlechteres Wachstum in 75% hA aufwies, als in der 1. AG. Mit der 3. und 4. AG steigerte sich das Wachstum auf eine maximale  $OD_{600} = 0,399$  nach 145 h (—) und eine maximale  $OD_{600} = 0,443$  nach 91 h (—). Die Wachstumsrate  $\mu$  der 3. AG von 0,00022/min und die Verdopplungszeit  $t_d$  von 52,1 h steigerte sich im Vergleich zur 2. AG ebenfalls. Für die 4. AG wurde diese weiterhin gesteigert mit  $\mu = 0,00038/\text{min}$  und  $t_d = 30,4$  h. diese Generation zeigte eine leicht geringere Wachstumsrate und etwas höhere Verdopplungszeit, erreichte jedoch eine höhere optisch Dichte, als die Kultur der 1. AG. Zudem erreichte diese auch früher ihre stationäre Phase. Mit der 5. AG zeigte der Stamm eine Verschlechterung des Wachstums mit  $\mu = 0,00027/\text{min}$  und  $t_d = 42,3$  h. Der Stamm wurde zu diesem Zeitpunkt in der exponentiellen Phase mit einer  $OD_{600} = 0,257$  (—) für die 6. Generation vorbereitet, in der die RNA-Isolierung durchgeführt wurde.

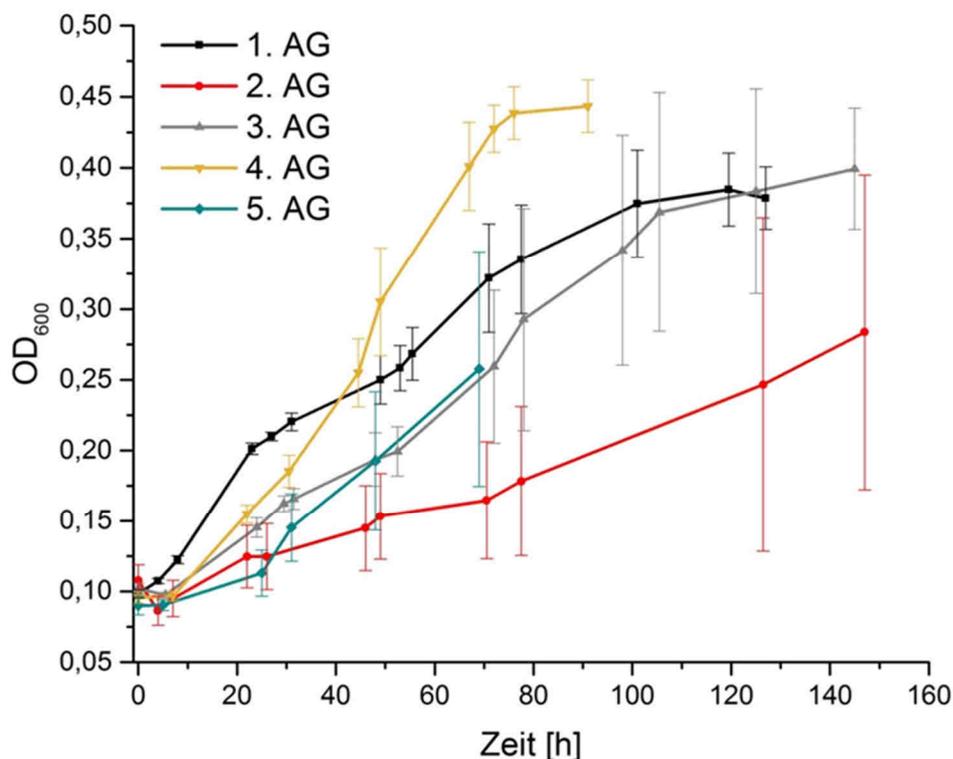


Abbildung 23: Wachstumsverhalten der 5 Adaptationsgenerationen (AG) von *G. sulfurreducens* in 75% hA. Dargestellt ist die gemessene OD<sub>600</sub> über die Zeit in h der 1. AG (—), 2. AG (—), 3. AG (—), 4. AG (—) und 5. AG (—). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Triplikates.

Tabelle 39: Wachstumsrate  $\mu$  und Verdopplungszeit  $t_d$  der 5 Adaptationsgenerationen (AG) von *G. sulfurreducens* bei 75% hA. Ergebnisse der Triplikate.

AG	Wachstumsrate $\mu$ in $\text{min}^{-1}$	Verdopplungszeit $t_d$ in h
1	0,00055	20,9
2	0,00013	88,0
3	0,00022	52,1
4	0,00038	30,4
5	0,00027	42,3

Trägt man lediglich den Ansatz des Triplikates jeder Adaptationsgeneration auf, welcher am stärksten gewachsen ist und somit als Inokulum für die nächste Generation verwendet wurde, erhält man, die in Abbildung 24 A dargestellten Wachstumskurven. Die Wachstumsrate  $\mu$  und Verdopplungszeit  $t_d$  sind in Tabelle 40 aufgeführt. Der Ansatz der 1. AG erreichte eine maximale OD<sub>600</sub> = 0,419 innerhalb von 119,5 h (—). Das errechnete  $\mu$  = 0,00057/min und  $t_d$  entspricht damit 20,2 h. Der Ansatz der zweiten AG zeigte wieder eine Verschlechterung der Wachstumsrate und eine längere Verdopplungszeit ( $\mu$  = 0,00020/min,  $t_d$  = 56,7 h). Zudem erreichte der Stamm erst nach 147 h eine max. OD<sub>600</sub> = 0,425 (—), was eine leichte Steigerung zu der maximalen optischen Dichte der 1. AG darstellte.

Mit der 3. AG konnte eine Verbesserung der Wachstumsrate und Verdopplungszeit ( $\mu = 0,00031/\text{min}$ ,  $t_d = 37,0 \text{ h}$ ) im Vergleich zur 2. AG nachgewiesen werden. Der Ansatz erreichte eine maximale  $OD_{600} = 0,444$  innerhalb von 125 h (—). Die maximale OD konnte mit der 4. Generation weiter gesteigert werden: der Stamm erreichte in nur 91 h eine  $OD_{600} = 0,467$  (—). Die Wachstumsrate  $\mu$  liegt bei  $0,00039/\text{min}$  und einer Verdopplungszeit von  $29,3 \text{ h}$ . Die 5. Generation zeigte wieder eine geringere Wachstumsrate  $\mu = 0,00036/\text{min}$  und eine Verdopplungszeit  $t_d = 31,8 \text{ h}$  (—). In der Abbildung 24 B sind die Adaptationsgenerationen 6 (—) und 1\_2 (—) dargestellt, welche für die RNA-Isolierung verwendet wurden. Hier zeigte sich deutlich, dass die Adaptationsgeneration 1\_2 eine Wachstumsrate von  $0,00055/\text{min}$  aufweist und eine Verdopplungszeit von  $20,9 \text{ h}$ . Diese gleicht dem Wert der vorherigen 1. Adaptationsgeneration. Für die 6. Adaptationsgeneration konnte ein  $\mu = 0,00042/\text{min}$  und ein  $t_d = 27,1 \text{ h}$  berechnet werden.

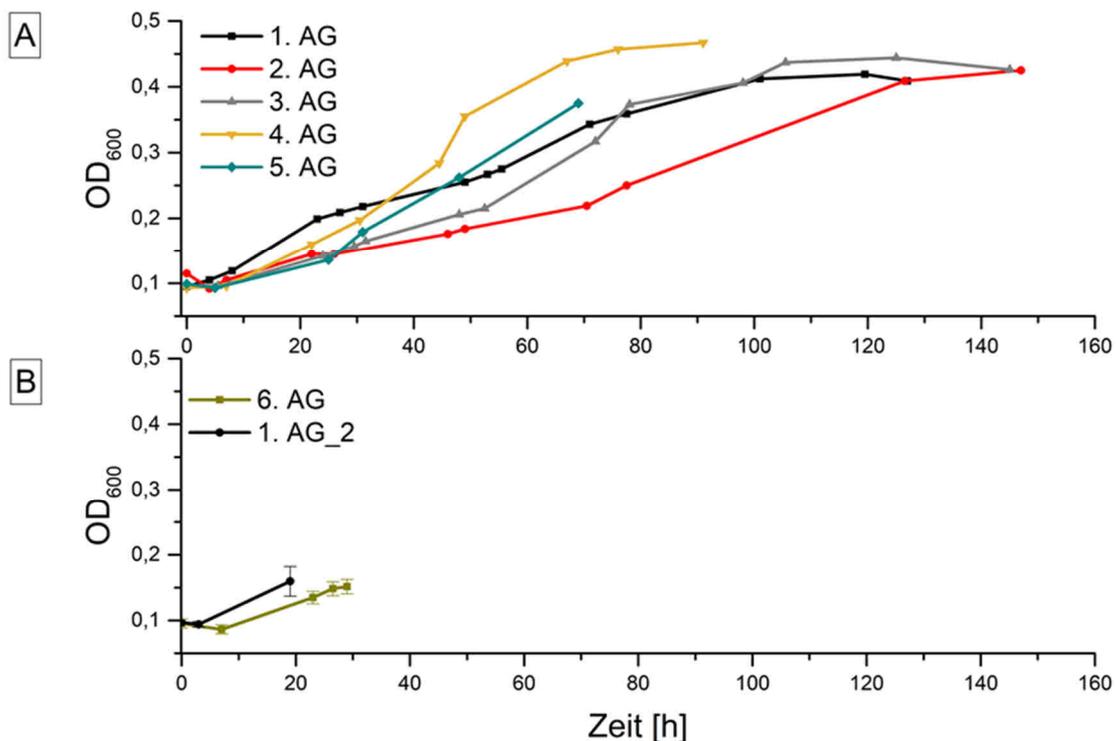


Abbildung 24: Wachstumsverhalten der Adaptationsgenerationen (AG) von *G. sulfurreducens* bei 75% hA. A) Dargestellt ist die gemessene  $OD_{600}$  über die Zeit in h der 1. AG (—), 2. AG (—), 3. AG (—), 4. AG (—) und 5. AG (—). In dieser Abbildung sind lediglich die Ansätze jeder Adaptationsgeneration dargestellt, welche das stärkste Wachstum zeigten und als Inokulum für die folgende AG dienen (Darstellung im Unikat). B) Dargestellt ist die gemessene  $OD_{600}$  über die Zeit in h der 6. AG (—) und einer weiteren 1. AG (2) (—), welche mit einer  $OD_{600} = 0,15$  geerntet und für die RNA-Isolierung verwendet wurden. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Triplikates.

Tabelle 40: Wachstumsrate  $\mu$  und Verdopplungszeit  $t_d$  des stärksten Ansatzes jeder der 5 Adaptationsgenerationen (AG) von *G. sulfurreducens* bei 75% hA.

AG	Wachstumsrate $\mu$ in $\text{min}^{-1}$	Verdopplungszeit $t_d$ in h
1	0,00057	20,2
2	0,00020	56,7
3	0,00031	37,0
4	0,00039	29,3
5	0,00036	31,8
6	0,00042	27,1
1_2	0,00055	20,9

#### 4.5.3. Wachstum bei erhöhter Phosphat- und Ammoniumkonzentration

Durch die Erhöhung der Phosphat- und Ammoniumkonzentration im *Geobacter*-Medium sollte die Konzentration der beiden Stoffe im hA-Abwasser simuliert und untersucht werden, ob diese gegebenenfalls einen Einfluss auf das Wachstum von *G. sulfurreducens* haben. In Abbildung 25 ist das Wachstum unter den unterschiedlichen Bedingungen dargestellt. Bei der Erhöhung der Phosphatkonzentration auf 41 mM (—) war lediglich ein geringer Unterschied zu der Konzentration von 4,26 mM (—), die normalerweise im Medium vorhanden war, zu sehen. Mit einer Wachstumsrate  $\mu = 0,00063/\text{min}$  und einer Verdopplungszeit von  $t_d = 18,1 \text{ h}$  (+ 41 mM  $\text{PO}_4^{3-}$ ) im Vergleich zu  $\mu = 0,00065/\text{min}$  und  $t_d = 17,7 \text{ h}$  (+ 4,26 mM  $\text{PO}_4^{3-}$ ) (siehe Tab. 41). Die maximal erreichte  $\text{OD}_{600}$  entsprach 0,751 innerhalb von 94,5 h für den Stamm im *Geobacter*-Medium ohne die Erhöhung der Phosphat-Konzentration und 0,663 in 97,5 h für das Medium mit 41 mM  $\text{PO}_4^{3-}$ . Der Ansatz mit der erhöhten Ammoniumkonzentration von 17,62 mM  $\text{NH}_4^+$  zeigte im Vergleich zu dem mit der Konzentration von 3,9 mM, welche normalerweise im *Geobacter*-Medium vorhanden war, eine deutliche Steigerung der Wachstumsrate mit 0,00098/min und damit einer Verdopplungszeit von 11,8 h. Nach 70,5 h war bereits eine maximale  $\text{OD}_{600} = 1,57$  erreicht (—). Erhöhte man sowohl die Ammonium- als auch die Phosphatkonzentration, wurde die gleiche Wachstumsrate und Verdopplungszeit erreicht, wie wenn ausschließlich die Ammoniumkonzentration erhöht wurde ( $\mu = 0,00098/\text{min}$ ,  $t_d = 11,8 \text{ h}$ ). Die maximale  $\text{OD}_{600} = 1,31$ , welche innerhalb von 70,5 h erreicht war (—).

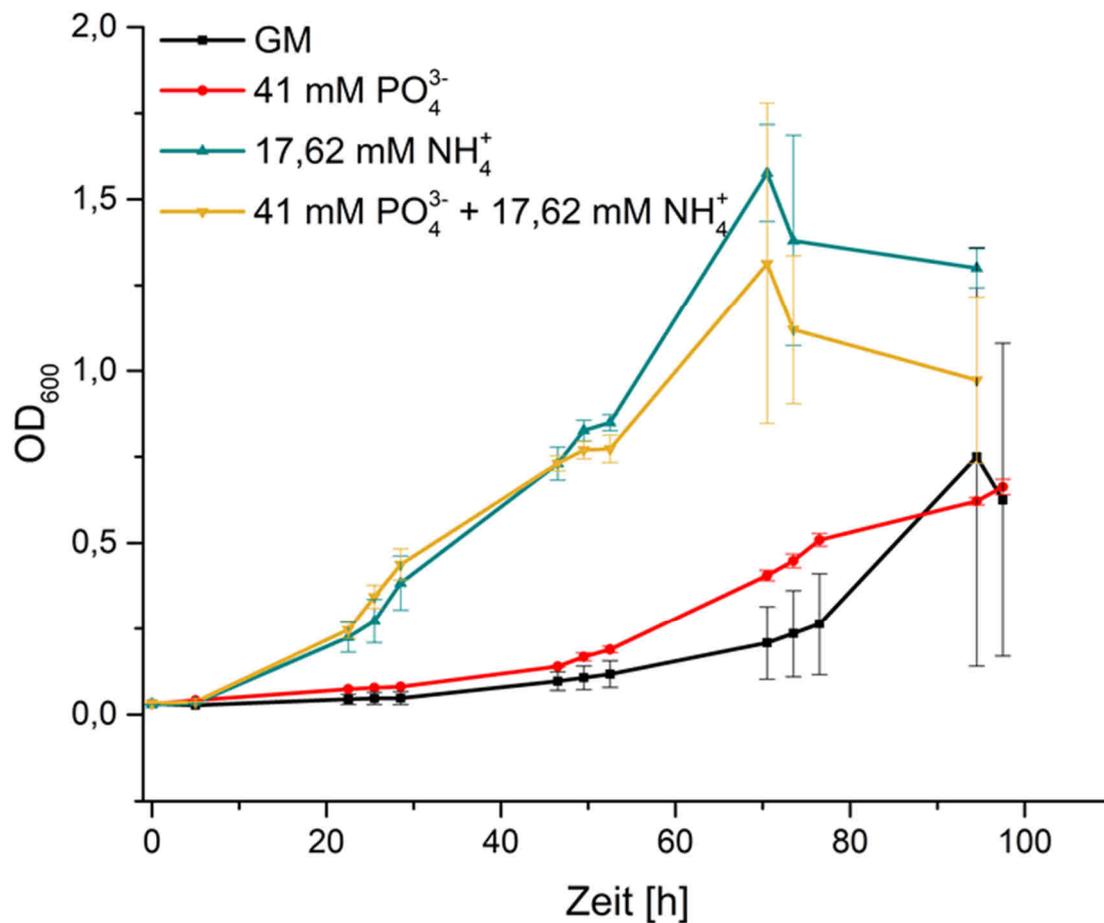


Abbildung 25: Wachstumsverhalten von *G. sulfurreducens* mit den potentiellen Störstoffen Phosphat ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) und Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ). Dargestellt ist die gemessene  $\text{OD}_{600}$  über die Zeit in h in Geobacter-Medium (—), mit 41 mM  $\text{PO}_4^{3-}$  (—), 17,62 mM  $\text{NH}_4^+$  (—) und 41 mM  $\text{PO}_4^{3-}$  und (—) und 17,62 mM  $\text{NH}_4^+$ . Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Triplikates.

Tabelle 41: Wachstumsrate  $\mu$  und Verdopplungszeit  $t_d$  von *G. sulfurreducens* mit den potentiellen Störstoffen Phosphat ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) und Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ).

Ansatz	Wachstumsrate $\mu$ in $\text{min}^{-1}$	Verdopplungszeit $t_d$ in h
41 mM $\text{PO}_4^{3-}$	0,00063	18,1
17,62 mM $\text{NH}_4^+$	0,00098	11,8
41 mM $\text{PO}_4^{3-}$ & 17,62 mM $\text{NH}_4^+$	0,00098	11,8
GM	0,00065	17,7

## 4.6. M3C mit hA-Abwasser im Batch

Für einen ersten Überblick zur Ermittlung der Stromproduktion und Aufbereitung des Abwassers hinsichtlich des Substratabbaus durch die isolierten Mikroorganismen, wurden die M3C-Reaktoren im Batch-System betrieben. Über drei Wochen wurden 3 verschiedene Ansätze und eine Negativkontrolle getestet:

- (1) Ansatz 1: Isolate (*Clostridium* sp. I, *Clostridium* sp. II, *Paenibacillus* sp., *E. coli*)
- (2) Ansatz 2: Isolate (*Clostridium* sp. I, *Clostridium* sp. II, *Paenibacillus* sp., *E. coli*) und der Laborstamm *G. sulfurreducens* (Barcode)
- (3) Ansatz 3: Laborstamm *G. sulfurreducens* (Barcode)
- (4) Negativkontrolle: hA-Abwasser NI (nicht inokuliert)

In Abbildung 26 sind die gemessenen Stromdichten des ersten und zweiten Ansatzes und die der Negativkontrolle dargestellt. Der Ansatz 2 mit den Isolaten und *G. sulfurreducens* zeigte hierbei die höchste gemessene Stromdichte mit  $12,33 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  nach ca. 12 h. Jedoch sank diese bis Tag 7 kontinuierlich, bis sie den Nullwert erreichte. Nach diesen 7 Tagen wurde das Abwasser im System einmal komplett ausgetauscht (| 1, Abb. 26). Nach dem Austausch stieg die Stromdichte bis auf  $2,47 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  (Tag 11) an und fiel sehr schnell wieder ab, bis an Tag 14 eine Stromdichte von  $0,085 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  erreicht war. In dieser zweiten Woche wurde lediglich 1/5 der maximal gemessenen Stromdichte der ersten Woche erreicht. Nach 14 Tagen wurde abermals das Abwasser ausgetauscht (| 2, Abb. 26) und auch hier war ein Anstieg der Stromdichte zu erkennen. An Tag 17 wurde ein Wert von  $1,65 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  erreicht. Diese konnte über einen Zeitraum von ca. 3 Tagen mehr oder weniger aufrechterhalten werden. An Tag 21 lag die gemessene Stromdichte bei  $0,63 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . Die Stromdichte wurde auf die Anodenfläche von  $36 \text{ cm}^2$  bezogen. Daraus ergibt sich für den 2. Ansatz mit den Isolaten und *Geobacter* eine mittlere Stromdichte von  $15 \text{ mA}/\text{m}^2$  (—). Ansatz 1, der lediglich die Leistung der Isolate in der M3C untersucht, zeigte innerhalb von 2 Tagen einen Anstieg der Stromstärke auf  $2,68 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . Bis Tag 7 fiel diese wieder bis auf  $0,16 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . Zu diesem Zeitpunkt wurde das Abwasser ausgetauscht, wodurch es wieder zu einem Anstieg der Stromstärke auf  $1,33 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  bis Tag 9 kam. Ab diesem Zeitpunkt war wieder ein Abfall bis auf  $0,35 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  (Tag 14) zu beobachten, woraufhin das hA wieder ausgetauscht wurde. In der letzten Woche wurde lediglich eine max. Stromdichte von  $1,14 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  (Tag 16) erreicht. In den darauffolgenden Tagen sank auch hier die Stromdichte wieder auf  $0,19 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  bis zu Ende des Experiments an Tag 21. Die hier kalkulierte mittlere Stromdichte liegt lediglich bei  $7,56 \text{ mA}/\text{m}^2$  (—), etwa die Hälfte der mittleren Stromdichte aus Ansatz 2 mit  $14,89 \text{ mA}/\text{m}^2$ . In beiden Experimenten (Ansatz 1 — und Ansatz 2 —) konnte beobachtet werden, dass die max. Stromdichte, welche in der ersten Woche

erreicht wurde, in den darauffolgenden zwei Wochen nicht mehr erreicht werden konnte. Das Experiment mit dem inokulierten hA-Abwasser zeigte keine Stromproduktion (—).

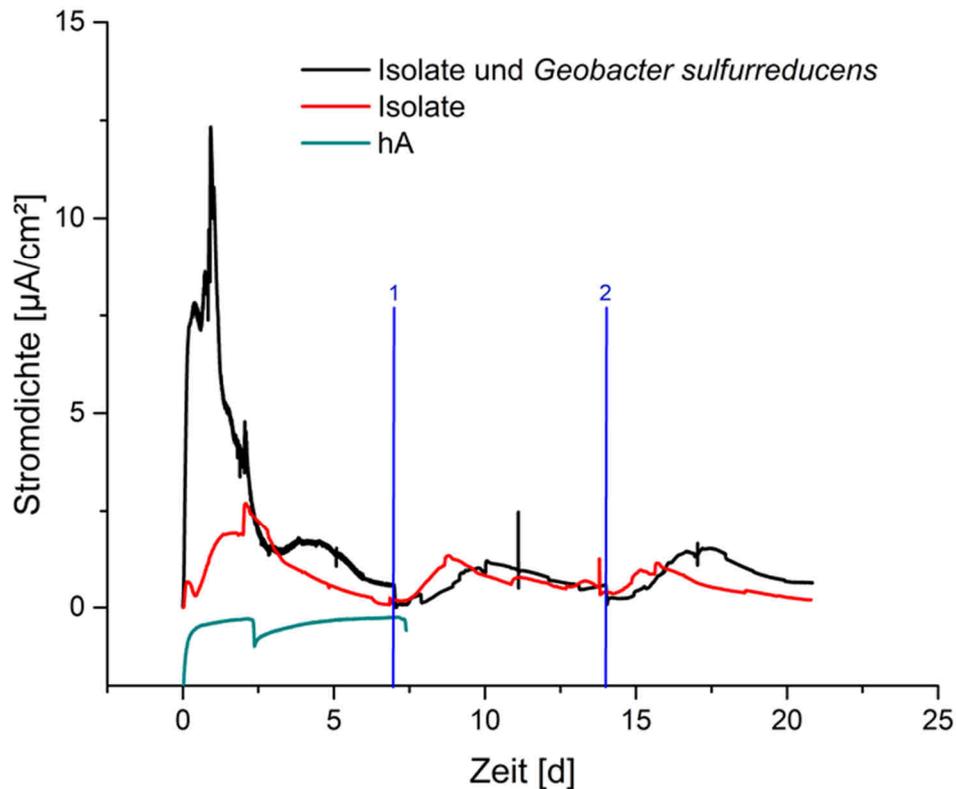


Abbildung 26: Gemessene Stromdichte der Ansätze 1 und 2 und der Negativkontrolle in der M3C mit hA-Abwasser im Batch-System über 21 Tage. Dargestellt ist die Stromdichte in  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  über die Zeit in d des Ansatzes mit den Isolat (—), mit den Isolat und *G. sulfurreducens* (—) und der Kontrolle mit unbeimpftem hA-Abwasser (—). An den eingezeichneten Markierungen ist der Austausch des hA-Abwassers nach 7 (| 1) und 14 (| 2) Tagen gekennzeichnet. Die Graphen entsprechen den Mittelwerten der Triplikate eines jeden Ansatzes.

Während des Versuchszeitraumes von drei Wochen wurde in allen Ansätzen regelmäßig die Acetatkonzentration, der TOC und der pH-Wert gemessen (siehe Abb. 27 und 28). Ansatz 1 zeigte eine Zunahme in der Acetatkonzentration in allen 3 Wochen. In der ersten Woche stieg die Konzentration von 46,38 mM auf 48,32 mM, was einem Anstieg von 1,94 mM und damit 4% entsprach. In der darauffolgenden Woche stieg die Konzentration von 48,53 mM auf 51,04 mM. Dies war ein Anstieg von 2,51 mM, d.h. 4,9%. In der dritten Woche war ein Anstieg von 47,43 mM auf 48,53 mM zu verzeichnen (Anstieg von 1,1 mM = 2,3%). Im Durchschnitt war das eine Zunahme von 1,85 mM (3,73%) pro Woche, bezogen auf 36  $\text{cm}^2$  Anodenfläche. Damit ergibt sich eine Acetat-Produktion von 513,89 mM pro Woche und  $\text{m}^2$  (—, Abb. 27). Bei Ansatz 2 mit den Isolat und *G.*

*sulfurreducens* ließ sich lediglich ein Trend abzeichnen. In der ersten Woche schien es eine leichte Abnahme der Acetatkonzentration von 46,99 mM auf 46,52 mM zu geben. Das entsprach einer Abnahme von 0,47 mM (1%). In der zweiten Woche hingegen ist ein Anstieg der Acetatkonzentration um 2,72 mM zu verzeichnen: 47,17 mM auf 49,89 mM. In der letzten Woche wiederum sank die Konzentration von 48,52 mM auf 45,09 mM, was einem Verbrauch von 3,43 mM entspricht. Aufgrund der fluktuierenden Werte konnte hier kein eindeutiger Verbrauch von Acetat berechnet werden (—, Abb. 27). Vergleicht man den TOC beider Ansätze miteinander, fällt auf, dass sowohl in dem Ansatz mit den Isolaten als auch in dem Ansatz mit den Isolaten und *Geobacter* über die Zeit TOC verbraucht wurde. In der ersten Woche verbrauchten die Isolate in Ansatz 1 0,1 g/L TOC (5%). Hier sank der TOC von 2,02 auf 1,92 g/L. In der zweiten Woche sank der Wert von 2,08 auf 1,97 g/L (Abnahme von 0,1 g/L = 5%) und in der dritten Woche von 2,29 auf 2,16 g/L (Abnahme von 0,13 g/L = 6%). Das entspricht einer durchschnittlichen Abnahme von 0,11 g/L pro Woche (5%), bezogen auf 36 cm<sup>2</sup> und damit 30,6 g/L pro Woche und m<sup>2</sup>. Insgesamt wurden innerhalb der 3 Wochen 0,33 g/L (15,49%) TOC verbraucht (—, Abb. 27). Bei dem Ansatz mit den Isolaten und *G. sulfurreducens* wurden innerhalb der 3 Wochen insgesamt 0,76 g/L TOC verbraucht. Das entspricht 36,09% der durchschnittlichen Ausgangsmenge des TOC. In der ersten Woche metabolisierten die Organismen 0,3 g/L (14%). Der TOC sank dabei von 2,24 ± 0,16 auf 1,93 g/L. In der 2. und 3. Woche wurden jeweils 11% des TOC mit 0,23 g/L bei einer Abnahme von 2,10 auf 1,87 und 2,11 auf 1,88 g/L verbraucht. Für diesen Ansatz ergibt sich damit eine durchschnittliche TOC-Abnahme von 0,25 g/L pro Woche (12% bei 36 cm<sup>2</sup> Anodenfläche) und 70,37 g/L pro Woche und m<sup>2</sup> (—, Abb. 27).

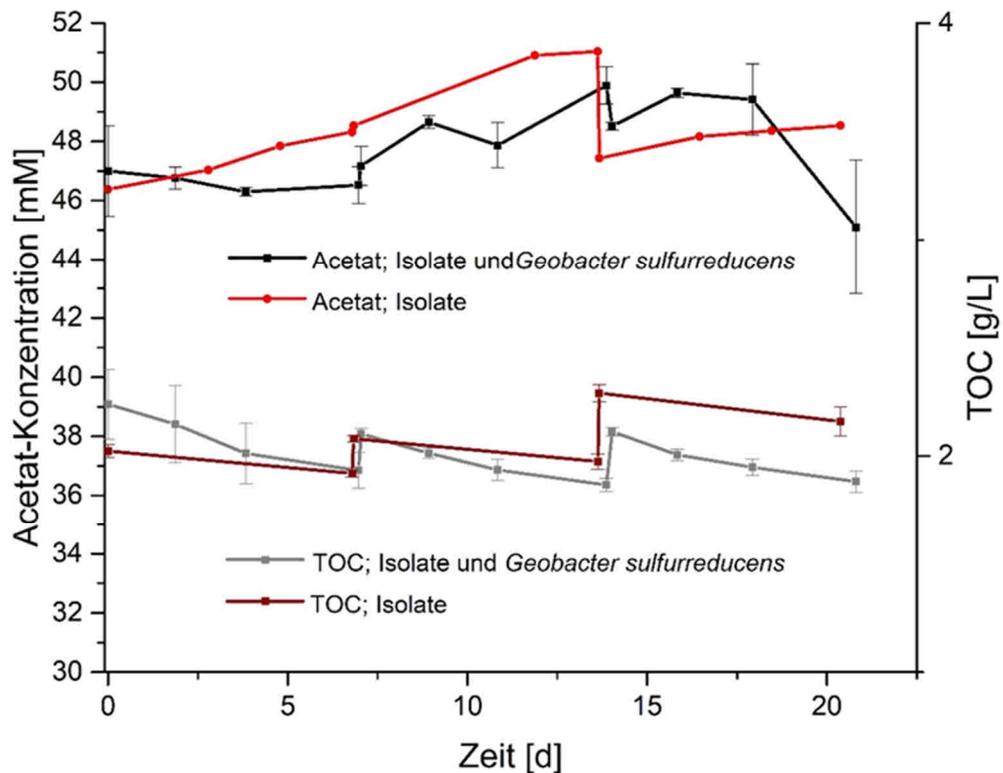


Abbildung 27: Acetatkonzentration [mM] und TOC [g/L] der Ansätze 1 und 2 in der M3C mit hA-Abwasser im Batch-System über 21 Tage. Dargestellt ist die Acetatkonzentration in mM über die Zeit in d des Ansatzes mit den Isolaten (—) und mit den Isolaten und *G. sulfurreducens* (—). Zudem ist der TOC in g/L über die Zeit mit den Isolaten (—) und mit den Isolaten und *G. sulfurreducens* (—) dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der jeweiligen Triplikate.

Zudem wurde sichtbar, dass der pH-Wert in den Systemen beider Ansätze stark abfiel (Abb. 28 A). Innerhalb der ersten 2 Tage sank der pH-Wert in Ansatz 1 von 7,6 auf 6,4. Dieser Abfall korrelierte mit dem Zeitraum der gemessenen hohen Stromdichte. Während dieser Zeit wurde der pH-Wert täglich mit 1 M NaOH wieder auf ca. 7,2 eingestellt. Ab Tag 3 bis Tag 7 blieb der pH-Wert hingegen stabil zwischen 7,4 und 7,7. Auch in der zweiten Woche, nach Austausch des hA-Abwassers (Tag 7), konnte beobachtet werden, dass der pH-Wert bis Tag 9 von 7,9 auf 6,4 absank. Dies korrelierte ebenfalls mit der hohen Stromdichte der 2. Woche. In den 2 Tagen wurde der pH-Wert wieder täglich mit 1 M NaOH auf pH 7,2 titriert. Von Tag 10 bis 14 blieb auch hier der pH-Wert stabil auf 7,2 bis 7,7. An Tag 14 wurde abermals das Abwasser getauscht. Die dritte Woche zeigte gleichermaßen einen Abfall des pH-Wertes innerhalb der ersten beiden Tage, wie in den Wochen zuvor. Von Tag 14 bis 16 sank er von 7,6 auf 6,6 (Korrelation mit der höchsten Stromdichte in Woche 3) mit einer anschließenden konstanten Phase (pH 7,3 bis 7,8) bis Tag 21. In den ersten beiden Tagen wurde der pH-Wert wieder täglich auf ca. 7,2 eingestellt (—). Ansatz 2 zeigte den gleichen Abfall des pH-Wertes innerhalb der beiden ersten Tage jeder Woche. In der ersten Woche fiel

der pH-Wert von 7,9 auf 6,4, in Woche 2 von 7,9 auf 7,2 und in der dritten Woche von 8,1 auf 7,7. Ab dem 3. Tag jeder Woche war wieder ein konstanter pH-Wert messbar. Dieser schwankte zwischen 7,9 und 8,1. Auch hier wurde der pH-Wert in den ersten 2 Tagen jeder Woche einmal täglich mit 1 M NaOH auf ca. 7,2 eingestellt. Der pH-Wert-Abfall der 2. und 3. Woche war in diesem Versuch nicht mehr so stark, wie in der ersten Woche (—). Auch dies korrelierte mit der Stromdichte, die in diesen Wochen erreicht wurde ( $12,33 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  in der ersten Woche,  $2,47 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  in der zweiten Woche und  $1,65 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  in der dritten Woche. In Abbildung 28 B ist die Acetatkonzentration (—), der TOC (—) und der pH-Wert (—) in dem Ansatz der Negativkontrolle dargestellt. Hier ist deutlich zu sehen, dass sich alle drei Werte über die Zeit nicht veränderten.

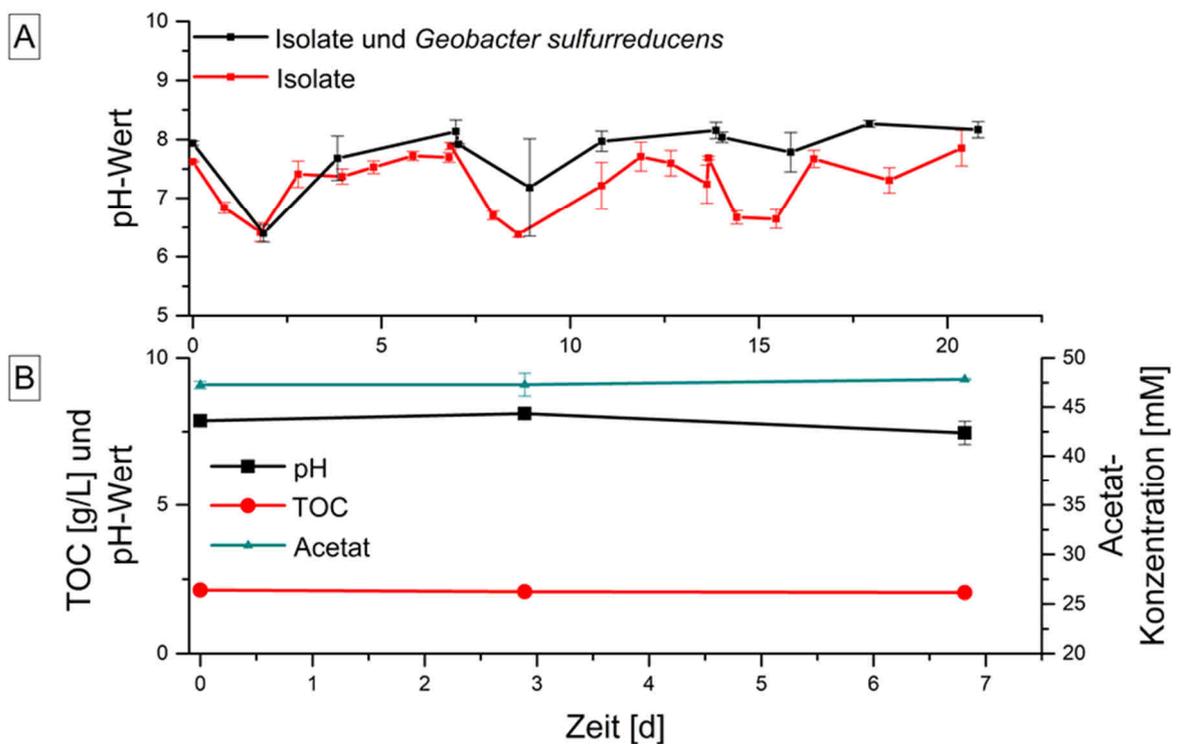


Abbildung 28: pH-Wert der Ansätze 1 und 2 in der M3C mit hA-Abwasser im Batch-System über 21 Tage und Daten der Negativkontrolle mit dem NI hA-Abwasser. A) Dargestellt ist der pH-Wert über die Zeit in d des Ansatzes mit den Isolaten (—) und mit den Isolaten und *G. sulfurreducens* (—). B) Die Graphen zeigen den pH-Wert (—), den TOC in g/L (—) und die Acetatkonzentration in mM (—) über die Zeit in d. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der jeweiligen Triplikate.

Für die Berechnung der Coulomb'schen Effizienz (CE) (siehe 3.9. M3C-Systeme mit hA-Abwasser), wurde das prozentuale Verhältnis der auf die Elektrode übertragenen Elektronen zu den aus dem metabolisierten Gesamt-TOC, der in 3 Wochen freiwerdenden Elektronen berechnet. Für Ansatz 1 ergibt sich  $\text{CE} = 1,6\%$  und für Ansatz 2  $\text{CE} = 1,3\%$ .

Im 3. Ansatz, in welchem die Leistung des Laborstammes *Geobacter sulfurreducens* in der M3C mit hA-Abwasser untersucht wurde, wurde zunächst, wie auch bei den Ansätzen zuvor, mit N<sub>2</sub> begast. In Abbildung 29 ist deutlich zu erkennen, dass der Stamm nicht in der Lage war, unter diesen Bedingungen Strom zu erzeugen (—). Zudem wurde weder Acetat (—), noch TOC (—) abgebaut. Auch der pH-Wert (—) blieb über die Zeit konstant (siehe Abb. 31 A). Es ist ebenfalls zu beobachten, dass der Organismus bräunlich-rote Aggregate bildete, welche sich an den Bauteilen des Reaktors ablagerten und am Boden sedimentierten (siehe Abb. 30 A). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Begasung auf N<sub>2</sub> / CO<sub>2</sub> (80% / 20%) umgestellt. Dieser Versuch zeigte, dass der Laborstamm unter diesen Bedingungen in der Lage war, Strom zu produzieren (—, Abb. 29). Innerhalb der ersten 7,5 h stieg die Stromdichte auf 12,74 µA/cm<sup>2</sup> an, fiel aber daraufhin wieder auf 6,31 µA/cm<sup>2</sup> (24 h). Nach diesem Abfall konnte ein weiterer Anstieg auf 14,43 µA/cm<sup>2</sup> innerhalb der nächsten 4h verzeichnet werden. Zu diesem Zeitpunkt wurde der pH-Wert mit 1 M NaOH auf ca. 7,0 titriert, ebenso an den Tagen 2 bis 4. Bis Tag 4 fiel der Strom daraufhin wieder ab, es wurde eine Stromdichte von 2,09 µA/cm<sup>2</sup> erreicht. Bis Tag 7 stieg die Stromdichte wieder auf einen Wert von 5,31 µA/cm<sup>2</sup> an und fiel dann rapide auf -0,31 µA/cm<sup>2</sup> ab. Zu diesem Zeitpunkt war die Begasung ausgefallen und das Abwasser wurde einmal ausgetauscht (| 1, Abb. 29). Bis an Tag 12 stieg daraufhin die Stromdichte auf einen Wert von 4,71 µA/cm<sup>2</sup> an. Der darauffolgende Abfall der Stromdichte war zeitgleich mit dem Ausfall der Begasung. Daraufhin wurde die Begasung wieder angeschlossen und das Abwasser an Tag 14 erneut ausgetauscht (| 2, Abb. 29). In der letzten Woche wurde zunächst ein kontinuierlicher Strom von ca. 1,1 µA/cm<sup>2</sup> gemessen und stieg dann ab Tag 19 auf 1,78 µA/cm<sup>2</sup> an, bis der Versuch an Tag 21 gestoppt wurde. In der zweiten Woche wurde bis Tag 3 täglich mit 1 M NaOH und in der 3. Woche bis Tag 2 täglich mit 1 M NaOH der pH-Wert auf ca. 7,0 eingestellt. Für diesen Ansatz ergibt sich eine mittlere Stromdichte von 27,78 mA/m<sup>2</sup>. Während dieses Versuchs unter N<sub>2</sub> / CO<sub>2</sub>-Bedingungen, bildeten die Zellen keine Aggregate aus, sondern standen mit der Anode in direktem Kontakt. Wie Abbildung 30 B zeigt, kommt der Organismus nicht in der planktonischen Phase vor (siehe Abbildung 30 B).

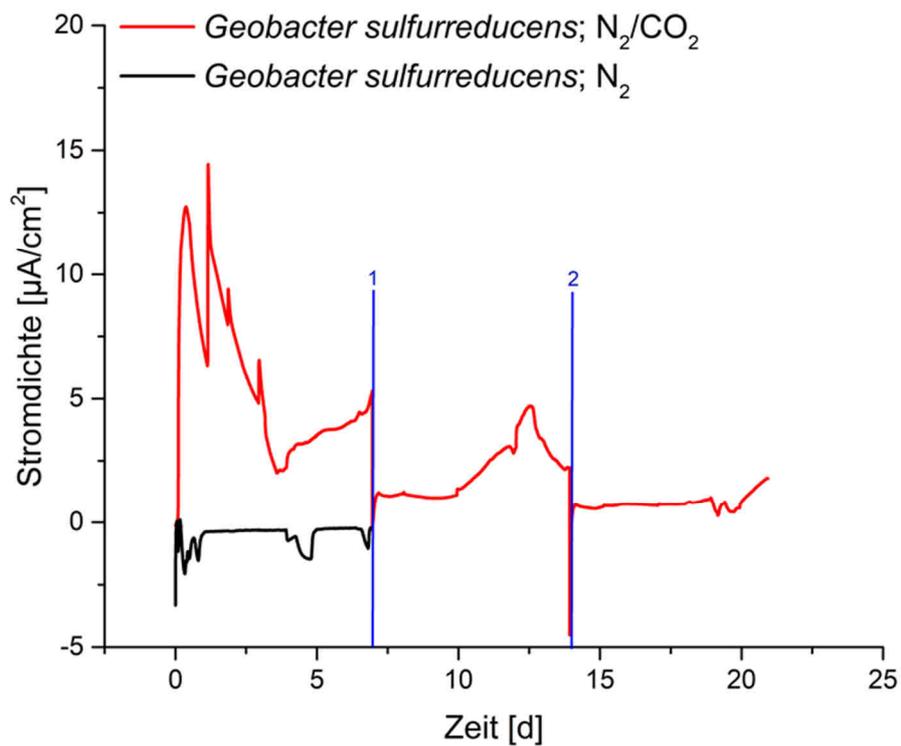


Abbildung 29: Gemessene Stromdichte des Ansatzes 3 in der M3C mit hA-Abwasser im Batch-System über 21 Tage. Dargestellt ist die Stromdichte in  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  über die Zeit in d des Ansatzes mit *G. sulfurreducens* und  $\text{N}_2$ -Begasung (—) und mit  $\text{N}_2/\text{CO}_2$ -Begasung (—). An den eingezeichneten Markierungen ist der Austausch des hA-Abwassers nach 7 (| 1) und 14 (| 2) Tagen gekennzeichnet. Die Graphen entsprechen den Mittelwerten der Triplikate der Ansätze.

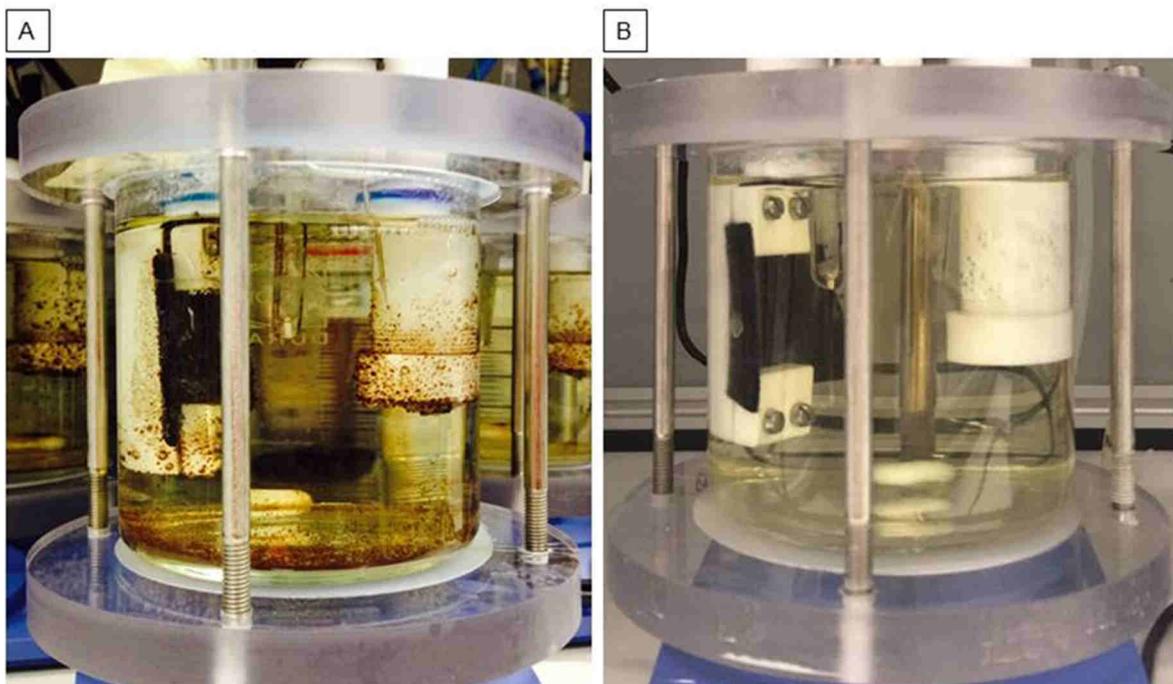


Abbildung 30: *G. sulfurreducens* im Batch-System der M3C mit hA-Abwasser (Ansatz 3). A) Mit  $\text{N}_2$ -Begasung. B) Mit  $\text{N}_2/\text{CO}_2$ -Begasung.

Während des Versuchszeitraumes von 3 Wochen wurde auch in diesem Ansatz, sowohl unter  $N_2$ - als auch unter  $N_2 / CO_2$ -Bedingungen, in regelmäßigen Abständen die Acetatkonzentration, der TOC und der pH-Wert gemessen (siehe Abb. 31 A und B). Wie bereits erwähnt, ist *G. sulfurreducens* mit  $N_2$ -Begasung nicht in der Lage Acetat (—) und TOC (—) abzubauen. Auch der pH-Wert (—) änderte sich über die Zeit nicht (siehe Abb. 31 A). Begaste man jedoch mit  $N_2 / CO_2$ , zeigte der Stamm eine Abnahme der Acetatkonzentration in allen 3 Wochen. In der ersten Woche wurden 8,43 mM Acetat abgebaut, die Konzentration sank von 45,95 mM auf 37,52 mM. Dies entspricht einem Verbrauch von 18%. In der darauffolgenden Woche wurden lediglich 2,9 mM Acetat abgebaut (6%). Die Konzentration sank von 52,72 mM auf 49,45 mM. In der dritten Woche war keine Abnahme der Acetatkonzentration zu messen. Die durchschnittliche Abnahme beträgt damit 3,78 mM pro Woche, bezogen auf 36 cm<sup>2</sup> Anodenfläche, was 9% der Anfangskonzentration entspricht. Damit ergibt sich eine Acetat-Abnahme von 1,05 M pro Woche und m<sup>2</sup>. Bei diesem Versuch wurden innerhalb der 3 Wochen insgesamt 11,33 mM Acetat verbraucht, was 22,95% der durchschnittlichen Ausgangskonzentration entspricht (—, Abb. 31 B). Betrachtet man den TOC in diesem Versuch, kann ebenfalls ein Abbau über alle 3 Wochen beobachtet werden. In der ersten Woche werden 0,25 g/L TOC (12%) abgebaut. Dieser sank dabei von 2,13 auf 1,88 g/L. In der zweiten Woche sank der Wert von 2,32 auf 1,23 g/L (Abnahme von 0,09 g/L = 4%) und in der dritten Woche von 2,18 auf 2,15 g/L (Abnahme von 0,03 g/L = 1%). Das entspricht einer durchschnittlichen Abnahme von 0,123 g/L pro Woche (6%), bezogen auf 36 cm<sup>2</sup> und damit 34,26 g/L pro Woche und m<sup>2</sup>. Insgesamt wurden innerhalb der 3 Wochen 0,37 g/L (16,47%) TOC verbraucht (—, Abb. 31 B). Der Abbau von 8,43 mM Acetat in der ersten Woche entspricht 0,2 g/L TOC. Der gemessene abgebaute TOC in dieser Woche war 0,25 g/L. Damit entspricht dies bis auf 0,05 g/L der abgebauten Acetatkonzentration. In der zweiten Woche wurden lediglich 2,9 mM Acetat abgebaut, was 0,07 g/L TOC entsprechen. Der gemessene abgebaute TOC liegt bei 0,09 g/L. Auch hier entspricht der kalkulierte abgebaute TOC der abgebauten Acetatkonzentration. In der letzten Woche konnte jedoch kein Abbau von Acetat detektiert werden. Der gemessenen abgebaute TOC ist hier mit 0,03 g/L sehr gering. Umgerechnet wären das ca. 1,25 mM Acetat, welches in dieser Woche abgebaut werden würde. Dies ist vermutlich aufgrund der zu geringen Konzentration nicht zu detektieren. Der pH-Wert in diesem Versuch war weitestgehend konstant zwischen 6,1 und 6,5 in der ersten Woche, 6,5 und 6,6 in der zweiten und auch in der dritten (—, Abb. 31 B). Um den pH für den Organismus jedoch in Richtung Optimum zu bringen, wurde in der ersten Woche in den ersten 4 Tagen täglich der pH-Wert auf ca. 7,2 mit 1 M NaOH titriert, in der 2. Woche bis Tag 3 und in der 3. Woche lediglich an Tag 1 und 2, da sich hier gegen Ende ein Gleichgewicht eingestellt hatte.

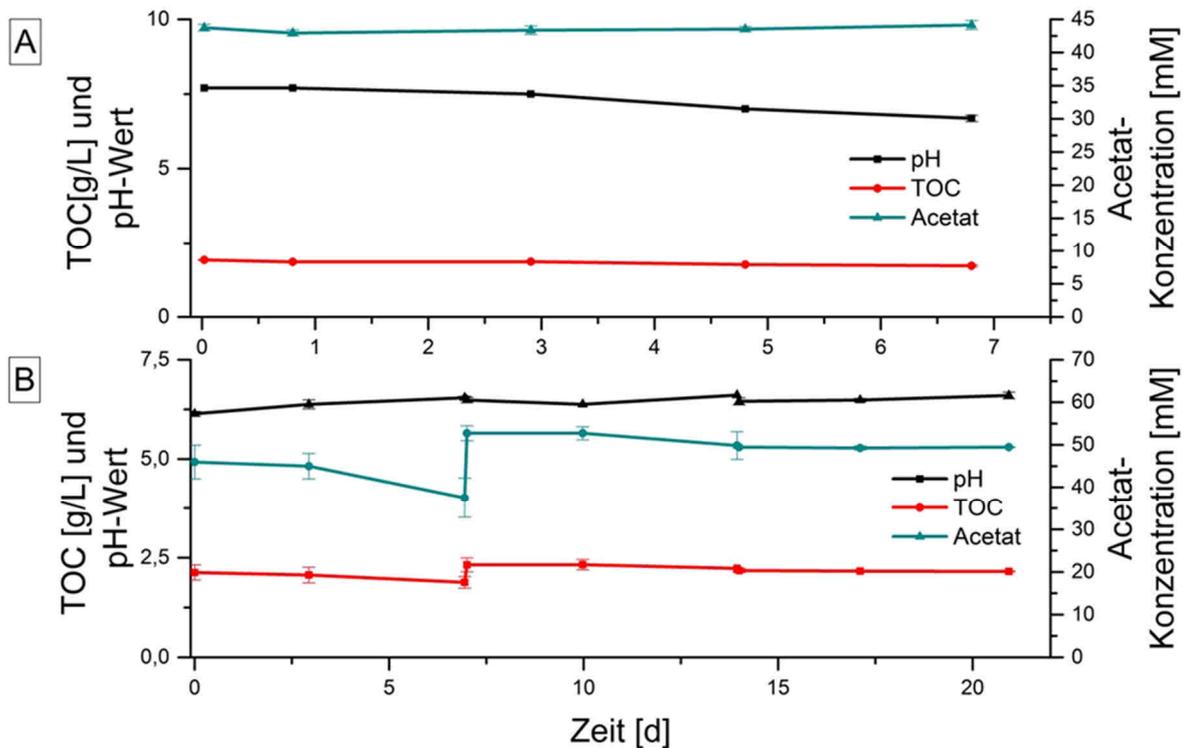


Abbildung 31: pH-Wert, TOC und Acetatkonzentration des 3. Ansatzes mit *G. sulfurreducens* in der M3C mit hA-Abwasser im Batch-System über 7 bzw. 21 Tage. A) Dargestellt ist der pH-Wert (—), der TOC in g/L (—) und die Acetatkonzentration in mM (—) über die Zeit in d von 7 Tagen mit N<sub>2</sub>-Begasung. B) Die Graphen zeigen den pH-Wert (—), den TOC in g/L (—) und die Acetatkonzentration in mM (—) über die Zeit in d von 21 Tagen mit N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-Begasung. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der jeweiligen Triplikate.

Die errechnete Coulomb'sche Effizienz (CE) des 3. Ansatzes mit *G. sulfurreducens* bei N<sub>2</sub> / CO<sub>2</sub>-Begasung beträgt 4,84%. Diese ist um das 3-fache, bzw. 3,7-fache höher als die CE in Ansatz 2 und 1, jedoch wiederum sehr gering.

In Abbildung 32 ist der mittlere TOC-Verbrauch [g/L pro m<sup>2</sup> und Woche] (■) und die mittlere Stromdichte [mA/m<sup>2</sup>] (■) der Ansätze 1, 2 und 3 (Isolate, Isolate und *G. sulfurreducens* und *G. sulfurreducens*) gegeneinander aufgetragen. Der direkte Vergleich zeigt, dass der mittlere TOC-Verbrauch der Isolate (Ansatz 1) mit 30,56 g/L zusammen mit dem TOC-Verbrauch von 34,26 g/L durch *G. sulfurreducens* in Ansatz 3, fast dem Wert des Verbrauchs von Ansatz 2 entspricht. Dieser zeigt einen mittleren TOC-Verbrauch von 70,37 g/L pro m<sup>2</sup> und Woche, wohingegen Ansatz 1 und Ansatz 3 zusammen einen mittleren TOC-Verbrauch von 64,82 g/L ergeben. Vergleicht man die Stromdichte der verschiedenen Experimente miteinander, wird deutlich, dass durch die Zugabe des Laborstammes *G. sulfurreducens* zu den Isolaten, die mittlere Stromdichte nahezu verdoppelt werden kann. Mit 7,56 mA/m<sup>2</sup> in dem Ansatz mit den Isolaten und 14,89 mA/m<sup>2</sup> in Ansatz 2 mit der Zugabe des Laborstammes. Eine abermalige Verbesserung zeigt Ansatz 2 mit 27,78 mA/m<sup>2</sup>.

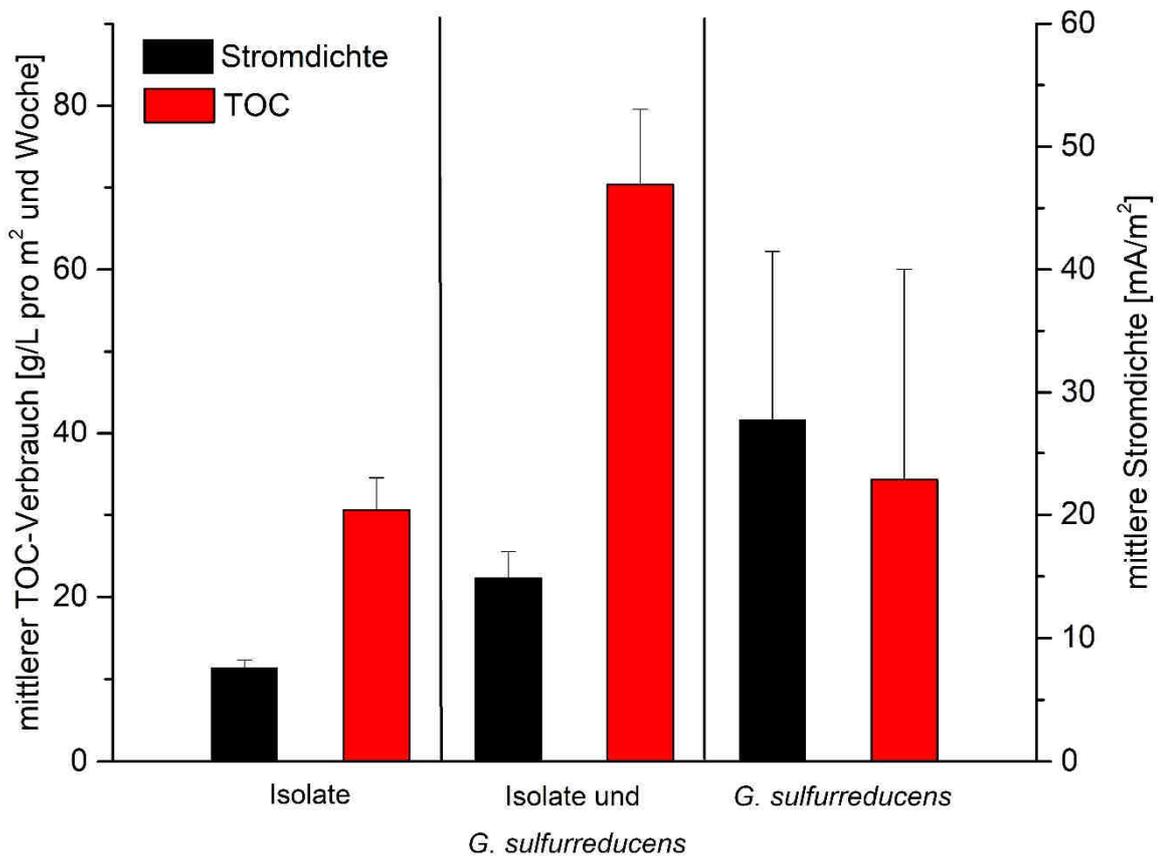


Abbildung 32: Mittlerer TOC-Verbrauch und mittlere Stromdichte der 3 Ansätze im Batch-System der M3C. Aufgetragen ist der mittlere TOC-Verbrauch in g/L pro m<sup>2</sup> und Woche (■) und die mittlere Stromdichte in mA/m<sup>2</sup> (■) des Ansatzes 1 mit den Isolat, des Ansatzes 2 mit den Isolat und *G. sulfurreducens* und des Ansatzes 3 mit *G. sulfurreducens* (N<sub>2</sub> / CO<sub>2</sub>-Begasung). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der jeweiligen Triplikate.

Für alle drei Ansätze wurde im Anschluss an das Experiment jeweils die Anode aus den Reaktoren entnommen und für weitere Analysen vorbereitet. Mit einem Teil der Anode (1 cm<sup>2</sup>) wurde eine FISH-Färbung durchgeführt. In Abbildung 33 sind die Bilder der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung dargestellt. Die Abbildungen 33 A und B sind von der Anode aus Ansatz 1 mit den Isolat aufgenommen worden. Für die Färbung wurde die EUB338-1-Sonde (rot - Cy3-Fluoreszenzfarbstoff) und DAPI (blau) verwendet. Hier wurden alle isolierten Stämme mit dem gleichen Farbstoff angefärbt, da lediglich ein Überblick über die Lokalisation der Bakterien im System ergeben sollte. In den Bildern ist zu sehen, dass die Organismen auf den Fasern der Anode kaum einen Biofilm ausbilden, hauptsächlich sind hier einzelne Organismen lokalisiert. Zudem befinden sich wenige Zellen direkt auf den Fasern (Abb. 33 B). In Abbildung 33 A hingegen ist ein Biofilm erkennbar, welcher nicht direkt auf einer Anodenfaser lokalisiert, sondern eher in dem Zwischenraum der Fasern vorzufinden ist. Der Biofilm besteht jedoch nicht ausschließlich aus den einzelnen Organismen, welche man deutlich erkennen kann, sondern es befinden sich auch erheblich kleinere, dünnere Fasern zwischen den Organismen. Somit erscheint der Biofilm als ein

lockeres Gebilde aus Organismen und den dünneren Fasern der Anode. In den Abbildungen 33 C und D sieht man den Ansatz mit den Isolate und *G. sulfurreducens*. Zusätzlich zu der EUB338-1-Sonde für die Isolate und DAPI, welches die DNA anfärbt, wurde die Geo\_2-Sonde mit dem grün fluoreszierenden FITC-Farbstoff für die Färbung des Laborstammes verwendet. Bei dieser Färbung ist deutlich zu sehen, dass hauptsächlich der Laborstamm *G. sulfurreducens* den Biofilm rund um die Anodenfasern ausbildet. Er erscheint als ein viel dichteres Gebilde, als der Biofilm der Isolate in Abbildung 33 A. In dem Biofilm sind auch einzelne rot angefärbte Zellen sichtbar (durch Pfeile im Bild markiert), welche größer sind als die Zellen von *G. sulfurreducens*. In den beiden letzten Bildern (Abb. 33 E und F) wurde *G. sulfurreducens* aus Ansatz 3 mit der Geo\_2-Sonde und dem Cy3-Fluoreszenzfarbstoff (rot) und DAPI (blau) angefärbt. Auf den Anodenfasern sind einzelne, kleinere Zellen zu sehen. *Geobacter* alleine bildet im Vergleich zu den Organismen des 2. Ansatzes auf den Anoden (Abb. 33 C und D) keinen Biofilm aus, obwohl dieser hauptsächlich aus *Geobacter*-Zellen besteht. Der Organismus befindet sich lediglich auf den Anodenfasern, nicht aber im Zwischenraum des Faser-Netzwerkes.

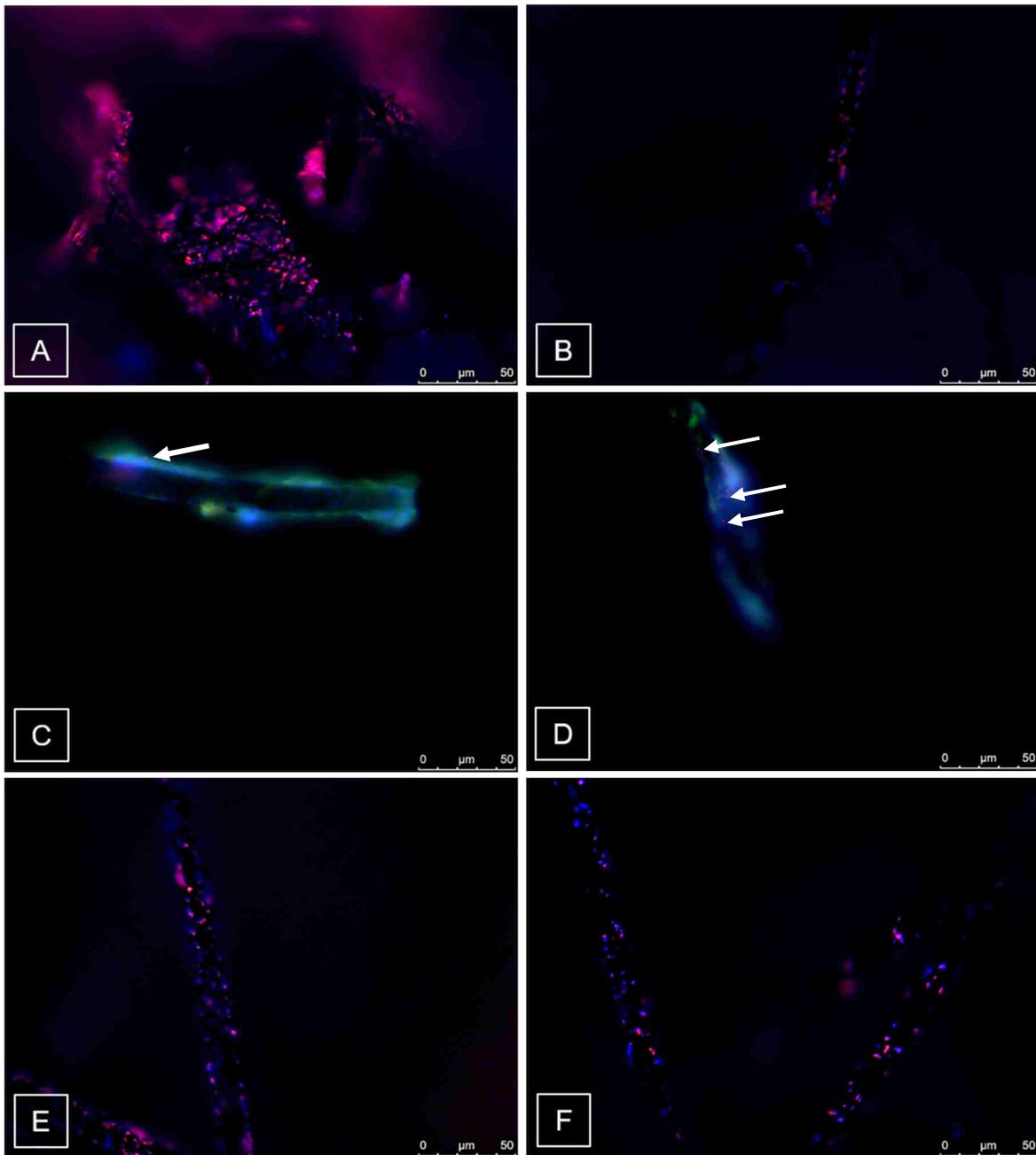


Abbildung 33: FISH-Färbung der Anode der Ansätze 1 bis 3 im Batch-System der M3C. A) und B) Ansatz 1 mit den Isolat. Färbung der isolierten Organismen mit der EUB338-1-Sonde (rot - Cy3-Fluoreszenzfarbstoff) und DAPI (blau). C) und D) Ansatz 2 mit den Isolat und *G. sulfurreducens*. Färbung der Isolat mit der EUB338-1-Sonde (rot - Cy3-Fluoreszenzfarbstoff) und DAPI (blau). *G. sulfurreducens* wurde mit der Geo\_2-Sonde (grün - FITC-Fluoreszenzfarbstoff) und DAPI (blau) angefärbt. Die Pfeile zeigen die rot gefärbten Zellen im Biofilm. E) und F) Ansatz 3 mit dem Laborstamm *G. sulfurreducens*. Färbung mit der Geo\_2-Sonde (rot - Cy3-Fluoreszenzfarbstoff) und DAPI (blau). Die Bilder sind ein Overlay der Fluoreszenzfarbstoffe. Fluoreszenzmikroskopie mit Dip-In-Objektiv mit 63 x Vergrößerung. Größenbalken 25 µm.

## 4.7. M3C mit hA-Abwasser im Durchfluss

Da sowohl die erzielte Stromdichte, als auch die Menge an verbrauchtem TOC, und somit auch die erreichte Coulomb'sche Effizienz, in den Batch-Experimenten sehr gering ausfiel, wurde der Reaktor auf ein Durchfluss-System umgestellt. Auch hier wurden wieder die folgenden Ansätze miteinander verglichen:

- (1) Ansatz 1: Isolate (*Clostridium* sp. I, *Clostridium* sp. II, *Paenibacillus* sp., *E. coli*)
- (2) Ansatz 2: Isolate (*Clostridium* sp. I, *Clostridium* sp. II, *Paenibacillus* sp., *E. coli*) und der Laborstamm *G. sulfurreducens* (Barcode)

Wie bereits erwähnt, wurde zunächst für die ersten 9 Tage eine Adaptationsphase im Batch-Verfahren durchgeführt, bevor das Abwasser mit einer geringen Flussrate bis zum völligen Austausch von Anodenmedium durch das hA-Abwasser durch das System gepumpt wurde. Im Anschluss wurden verschiedene Flussraten und deren Einfluss auf die Leistung des Systems getestet. Die Versuche wurden im Unikat unter N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-Begasung durchgeführt.

### 4.7.1. Durchfluss-System in den ersten 92 Tagen

In den ersten 92 Tagen wurde die Leistungsfähigkeit beider Ansätze parallel getestet. Abbildung 34 zeigt die erreichte Stromdichte in mA/cm<sup>2</sup> über diese Zeit für den Ansatz mit den Isolaten (—) und den Isolaten und *G. sulfurreducens* (—). Beide Strom-Kurven verhalten sich über den Messzeitraum nahezu identisch. Allerdings ist die produzierte Stromdichte in dem Ansatz mit dem Laborstamm höher als in dem ohne diesen.

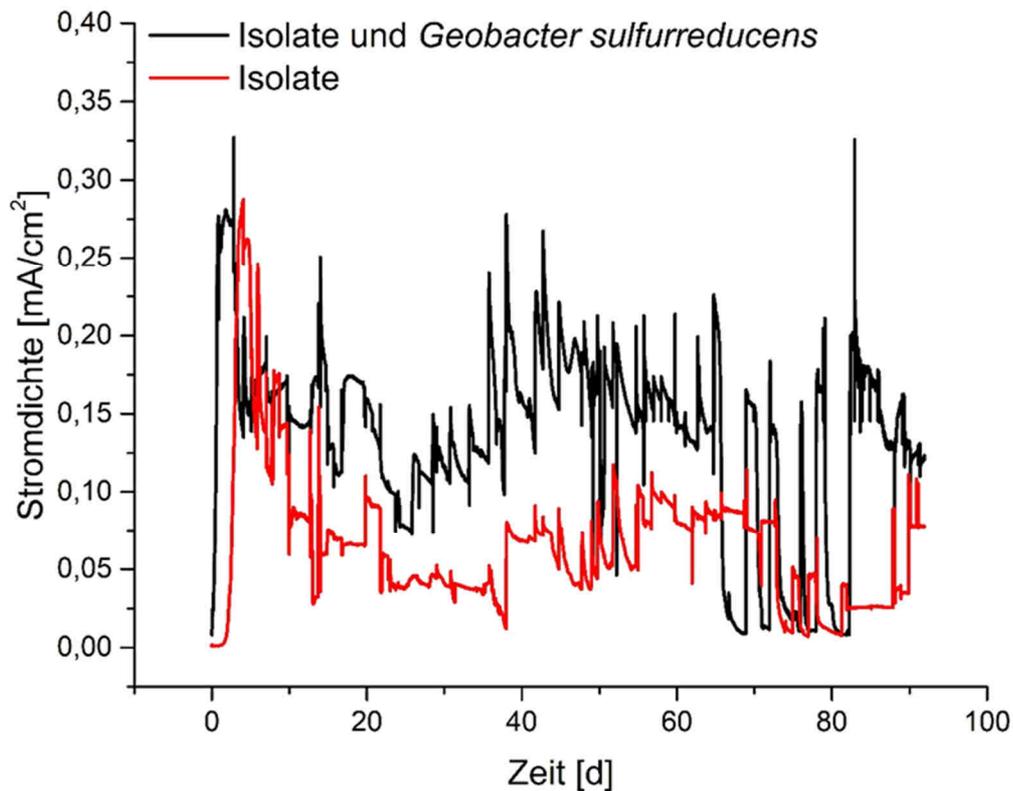


Abbildung 34: Gemessene Stromdichte der Ansätze 1 und 2 in der M3C mit hA-Abwasser im Durchfluss-System über 92 Tage. Dargestellt ist die Stromdichte in mA/cm<sup>2</sup> über die Zeit in d des Ansatzes mit den Isolaten (—) und mit den Isolaten und *G. sulfurreducens* (—).

In den ersten 9 Tagen der Adaptationsphase erreichte Ansatz 2 nach ca. einem Tag eine Stromdichte von 0,28 mA/cm<sup>2</sup>, welche an Tag 3 bis auf 0,33 mA/cm<sup>2</sup> anstieg und direkt wieder fiel. Ansatz 1 mit den Isolaten erreichte erst an Tag 4 eine Stromdichte von max. 0,28 mA/cm<sup>2</sup> (siehe Abb. 35 A), welche ebenfalls bis zum Anschalten der Pumpe an Tag 9 wieder abfiel. Nach diesen 9 Tagen (| 1, Abb. 35 A) wurde mit dem Austausch des Anodenmediums durch das hA-Abwasser begonnen. Mit einer Flussrate von 0,015 ml/min und einer HRT von 12,5 Tagen wurde bis Tag 21 das Medium einmal komplett ausgetauscht (| 2, Abb. 35 A). In dieser Zeit konnte beobachtet werden, dass der Strom nicht weiter sank. Die Stromdichte blieb in beiden Ansätzen, mit Ausnahme von zwei Anstiegen und einem errechneten mittleren Wert von 0,15 mA/cm<sup>2</sup> für Ansatz 2 mit den Isolaten und *G. sulfurreducens* (—, Abb. 35 A) und 0,08 mA/cm<sup>2</sup> für Ansatz 1 mit den Isolaten (—, Abb. 35 A), weitestgehend konstant. An Tag 35 wurde die Flussrate um 25% auf 0,01875 ml/min (HRT = 10 Tage) erhöht (| 3, Abb. 35 A). Ab diesem Zeitpunkt stieg die Stromdichte in beiden Ansätzen wieder leicht an. Was in dieser Zeit besonders in Ansatz 2 zu beobachten war, ist, dass mit jeder pH-Justierung auf ca. 7,2 mit 1 M NaOH die Stromdichte umgehend anstieg (↓ 4, Abb. 35 A und B). In diesem System musste der pH-Wert lediglich alle 2 Tage und nicht täglich, wie in den Batch-Reaktoren, neu eingestellt werden. Diese pH-Einstellung ist

deutlich etwa alle 2 Tage an den kleinen Anstiegen der Stromdichte zu sehen. Mit weiteren Erhöhungen der Flussrate auf 0,0234 ml/min (HRT = 8 Tage) an Tag 35 (| 5, Abb. 35 A) und 0,293 ml/min (HRT = 6,5 Tage) an Tag 37 (| 6, Abb. 35 A) stieg die Stromdichte weiter an bis auf einen max. Wert von 0,27 mA/cm<sup>2</sup> in Ansatz 2 (—, Abb. 35 A) und 0,08 mA/cm<sup>2</sup> in Ansatz 1 (—, Abb. 35 A)). Daraus ergab sich eine Steigerung der Stromdichte mit ansteigender Flussrate und absteigender HRT. An Tag 39 wurde die Flussrate wieder auf 0,0234 ml/min gesenkt (| 7, Abb. 35 A) aufgrund des zu diesem Zeitpunkt teilweise steigendem TOC und der steigenden Acetatkonzentration. Weder TOC noch Acetat wurden bei dieser hohen Flussrate optimal abgebaut (Abb. 36 A und B, | 4). An Tag 46 wurde die Flussrate auf 0,01875 ml/min gesenkt (| 8, Abb. 35 A) und an Tag 49 wurde die Ursprungs-Flussrate von 0,015 ml/min eingestellt (| 9, Abb. 35 A). Mit geringerer Flussrate und damit steigender HRT war somit eine Absenkung der Stromdichte von Tag 39 bis 49 zu beobachten. Bis Tag 65 pendelte sich die Stromdichte auf einen mittleren Wert von 0,15 mA/cm<sup>2</sup> für Ansatz 2 mit den Isolaten und *G. sulfurreducens* (—, Abb. 35 A) und 0,08 mA/cm<sup>2</sup> für Ansatz 1 mit den Isolaten (—, Abb. 35 A) ein. Nicht nur die Einstellung des pH-Wertes zeigte umgehend eine Veränderung der Stromstärke, sondern auch der Austausch des Kathodenmediums über eine Spritze war mit einem geringen Anstieg der Stromdichte messbar (↓ 10, Abb. 35 A). An den Tagen 60 und 84 wurde das Kathodenmedium neu aufgefüllt, bzw. ausgetauscht. Im Zeitraum zwischen Tag 65 und 82 ist es zu Betriebsproblemen der Anlage gekommen (■ 8, Abb. 35 A). Zum einen war die Begasung an Tag 66 ausgefallen, was deutlich an der abfallenden Stromdichte in Ansatz 2 (—, Abb. 35 A) zu sehen war und zum anderen sind die Schläuche für den Zu- und Ablauf des hA-Abwassers nach und nach verstopft, bis sie an Tag 83 einmal komplett ausgetauscht wurden. Für diesen Zeitraum wurde eine mittlere Stromdichte von 0,06 mA/cm<sup>2</sup> für Ansatz 2 (—, Abb. 35 A) und 0,05 mA/cm<sup>2</sup> für Ansatz 1 (—, Abb. 35 A) gemessen. Nach dem Austausch der Schläuche stieg vor allem in der M3C von Ansatz 1 (—, Abb. 35 A) die Stromdichte wieder bis zu einem Wert von 0,08 mA/cm<sup>2</sup> an Tag 92 an. Für Ansatz 2 mit dem Laborstamm war nach dem Austausch zunächst ein Anstieg auf 0,33 mA/cm<sup>2</sup> zu beobachten, allerdings fiel die Stromdichte bis Tag 92 wieder auf 0,12 mA/cm<sup>2</sup> (—, Abb. 35 A). Für diese 92 Tage wurde in Ansatz 1 eine mittlere Stromdichte von 656,97 mA/m<sup>2</sup> erreicht und für Ansatz 2 1368,25 mA/m<sup>2</sup>. Somit konnte, wie in den Batch-Systemen, mit der Zugabe des Laborstammes *G. sulfurreducens* die Stromdichte mehr als verdoppelt werden. Wie bereits erwähnt, ist der pH-Wert über die Zeit von 92 Tagen der beiden Ansätze in Abbildung 35 B dargestellt (— Ansatz 1, — Ansatz 2). In den ersten 21 Tagen bis zum vollständigen Austausch des Anodenmediums durch das hA-Abwasser war ein stufenweiser Abfall des pH-Wertes von pH 8 auf pH 7 in beiden Ansätzen (— Ansatz 1, — Ansatz 2) zu beobachten. Nach dem vollständigen Austausch kam es zu pH-Schwankungen von mindesten 6,16 bis maximal 7,5 in Ansatz 2 (—) und mindestens 6,36 bis maximal 7,5 in Ansatz 1 (—) bis zu Tag 92, wobei während

der hohen Flussraten von 0,0234 ml/min und 0,0239 ml/min zwischen Tag 35 und 46 die niedrigsten pH-Werte gemessen werden konnten. Diese niedrigen pH-Werte korrelieren ebenfalls mit den hohen Stromdichten, die zu dieser Zeit gemessen wurden. Nach der Einstellung der niedrigsten Flussrate konnte ein kontinuierlicher Anstieg der pH-Werte in beiden Ansätzen beobachtet werden, bis maximal 7,51 in Ansatz 2 (—) und 7,59 in Ansatz 1 (—) an Tag 80. Aufgrund des Durchfluss-Systems musste im Vergleich zu der Batch-Betriebsweise lediglich alle 2 Tage der pH-Wert mit 1 M NaOH auf ca. 7,2 eingestellt werden, anstatt täglich.

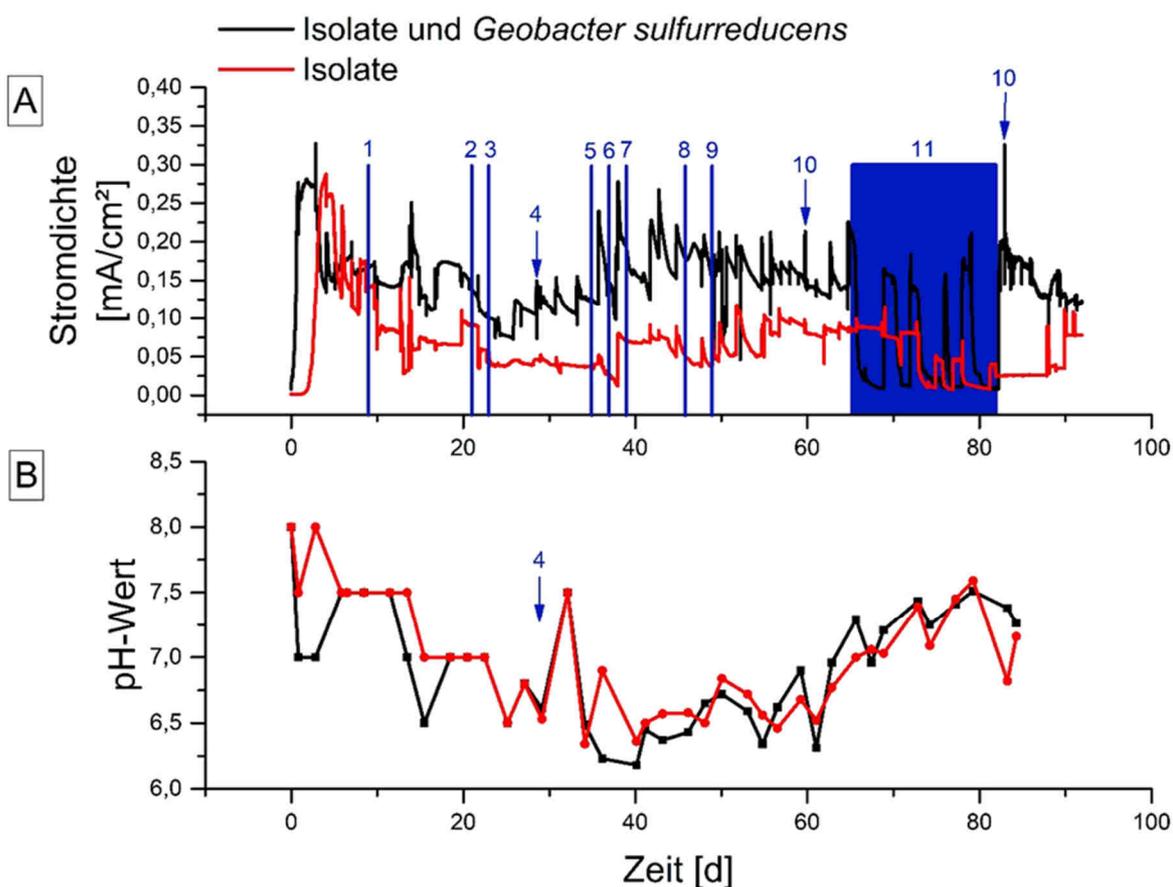


Abbildung 35: Gemessene Stromdichte und der pH-Wert der Ansätze 1 und 2 in der M3C mit hA-Abwasser im Durchfluss-System über 92 Tage. A) Dargestellt ist die Stromdichte in mA/cm<sup>2</sup> über die Zeit in d des Ansatzes mit den Isolaten (—) und mit den Isolaten und *G. sulfurreducens* (—). Die Markierungen zeigen die Ereignisse während der Versuchslaufzeit: Anschalten der Pumpe an Tag 9 mit einer Flussrate von 0,015 ml/min, HRT = 12,5 Tage (↓ 1), kompletter Austausch des Anodenmediums durch das hA-Abwasser an Tag 21 (↓ 2), Erhöhung der Flussrate an Tag 23 auf 0,01875 ml/min, HRT = 10 Tage (↓ 3), Zugabe von 1 M NaOH für die Einstellung des pH-Wertes (↓ 4), Erhöhung der Flussrate an Tag 35 auf 0,0234 ml/min, HRT = 8 Tage (↓ 5), Erhöhung der Flussrate an Tag 37 auf 0,0293 ml/min, HRT = 6,5 Tage (↓ 6), Senkung der Flussrate an Tag 39 auf 0,0234 ml/min, HRT = 8 Tage (↓ 7), Senkung der Flussrate an Tag 46 auf 0,01857 ml/min, HRT = 10 Tage (↓ 8), Senkung der Flussrate an Tag 49 auf 0,015 ml/min, HRT = 12,5 Tage (↓ 9). Austausch des Kathodenmediums (↓ 10), Betriebsprobleme der Anlage (■ 11). B) Diese Graphik zeigt den pH-Wert über die Zeit in d von 84 Tagen und die regelmäßige Titration den pH-Wertes (↓ 4).

In Abbildung 36 ist der TOC (Abb. 36 A) und die Acetatkonzentration (Abb. 36 B) über die Zeit von 84 Tagen dargestellt. Hier ist deutlich zu erkennen, dass während der ersten 9 Tage im Batch-Modus mit dem Anodenmedium sowohl der TOC, als auch die Acetatkonzentration abnahm. In diesen ersten 9 Tagen, bis zum Anschluss der Pumpe mit einer Flussrate von 0,015 ml/min, sank die Acetatkonzentration in Ansatz 1 um 6,66 mM von 10,72 mM auf 4,06 mM (| 1, Abb. 36 B, —). In dem Ansatz mit *G. sulfurreducens* sank die Acetatkonzentration um 8,03 mM von 11,42 mM auf 3,39 mM (| 1, Abb. 36 B, —). An Tag 11 wurde beiden Ansätzen 2,7 ml Nährstoffe in Form von 10 mM Acetat, 4,4 mM Propionat und 20 mM Laktat zugegeben (| 2, Abb. 36 A und B), da die Konzentration im Medium sehr gering war und der Strom zu dieser Zeit ebenfalls sank. Die Acetatkonzentration stieg daraufhin in Ansatz 1 bis auf 15,09 mM an und stieg auch nach der Zugabe kontinuierlich an bis auf 27,27 mM (Tag 36). Somit wurden in diesem System 8,42 mM Acetat in 25 Tagen produziert. An Tag 60 konnte eine Konzentration von 23,51 mM gemessen werden, welche in den folgenden Tagen (bis Tag 65) auf 7,48 mM sank. Ab Tag 65 bis 82 kam es zu Problemen mit der Anlage durch verstopfte Schläuche und den Ausfall der Begasung. Zu diesem Zeitraum war die Konzentration von Acetat sehr gering. Sie lag zwischen 6,94 mM und 12,0 mM (■ 6, Abb. 36 B, —). Gegen Ende des Messzeitraums an Tag 84 konnte eine leicht angestiegene Konzentration von 11,56 mM gemessen werden. Ansatz 2 zeigte nach der Zugabe der zusätzlichen Substrate einen Anstieg auf 13,22 mM Acetat (| 2, Abb. 36 B, —). Bei der niedrigen initialen Flussrate von 0,015 ml/min sank die Acetatkonzentration auf 9,65 mM bis an Tag 21 (vollständiger Austausch des Mediums, | 3, Abb. 36 B, —). Durch die anschließende kontinuierliche Erhöhung der Flussrate bis Tag 37, kam es zu einem Anstieg der Konzentration auf 15,32 mM Acetat (| 4, Abb. 36 B, —). Erst mit der kontinuierlichen Senkung der Flussrate ab Tag 39, war deutlich zu erkennen, dass die Acetatkonzentration bis Tag 53 stetig bis auf 4,23 mM sank. An Tag 49 wurde die initiale Flussrate von 0,015 ml/min wieder erreicht (| 5, Abb. 36 B, —). An Tag 59 lag die Konzentration in diesem Ansatz bei 3,8 mM. Bis zu diesem Zeitraum wurden, ausgehend von der max. erreichten Konzentration in diesem Ansatz (15,32 mM an Tag 37) 75,19% Acetat abgebaut. Zwischen dem Tag 65 und 82 kam es, wie bereits erwähnt, zu den Betriebsproblemen der Anlage. Der Acetatwert war auch in diesem Ansatz in dem Zeitraum sehr niedrig und liegt bei 0,55 mM bis 0,63 mM (■ 6, Abb. 36 B, —). In den ersten 9 Tagen sank der TOC in Ansatz 2 (—) um 0,48 g/L von 1,42 g/L auf 0,94 g/L und von 1,45 g/L auf 1,36 g/L in Ansatz 1 (0,09 g/L wurden verbraucht, —) (| 1, Abb. 36 A). An Tag 11 wurde dem System, wie bereits beschrieben, 2,7 ml Substrat in Form von Laktat, Propionat und Acetat zugegeben (| 2, Abb. 36 A). Daraufhin stieg der TOC in Ansatz 1 auf 1,52 g/L (| 2, Abb. 36 A, —). Bis Tag 32 wurde in dem System TOC abgebaut, er sank bis auf 1,11 g/L. Mit den hohen Flussraten kam es auch hier zu Schwankungen des TOC, der Abbau fand nicht mehr so kontinuierlich statt, wie zuvor (| 4, Abb. 36 A, —). Erst mit der niedrigen Flussrate von 0,015

ml/min wurde der Abbau wieder kontinuierlich fortgesetzt (| 5, Abb. 36 A, —). Bis Tag 57 wurde hier ein TOC von 1,065 g/L erreicht und damit wurden, ausgehend von dem höchsten Wert von 1,52 g/L nach der Zugabe der Nährstoffe, 29,93% TOC in dieser Zeit abgebaut (der Ausreißer an Tag 15 mit 1,95 g/L wird hier vernachlässigt, da er nicht mit der Zugabe der Nährstoffe in Verbindung gebracht werden kann). Auch die Betriebsprobleme der Anlage wirkten sich hier auf den TOC aus. In der Zeit, ab Tag 63 und auch schon vorher, sank der TOC weiter auf 0,33 g/L bis 0,68 g/L (■ 6, Abb. 36 A, —). An Tag 84 lag der TOC bei 0,56 g/L. Für den Ansatz mit den Isolaten und *G. sulfurreducens* wurde nach der Zugabe der Substrate ein TOC von 2,03 g/L gemessen (| 2, Abb. 36 A, —). An Tag 21 war das Anodenmedium vollständig durch das Abwasser ausgetauscht (| 3, Abb. 36 A). Mit den geringeren Flussraten von 0,015 ml/min und 0,01875 ml/min sank der TOC in Ansatz 2 bis zu Tag 32 nach der Zugabe der Substrate kontinuierlich bis auf 0,89 g/L. Wieder beeinflussten die hohen Flussraten (0,0234 ml/min an Tag 35 und 0,0293 ml/min an Tag 37) den TOC-Abbau, es kam zu Schwankungen (| 4, Abb. 36 A, —). Erst nach der Umstellung auf die initiale geringe Flussrate (| 5, Abb. 36 A, —), blieb auch hier der TOC-Abbau konstant (der Ausreißer an Tag 57 ist aufgrund der Zugabe von 20 ml hA-Abwasser, da aus dem Anodenkompartiment durch die Begasung Flüssigkeit verdrängt wurde) und erreichte an Tag 59 einen Wert von 0,55 g/L. Somit wurden bis zu diesem Zeitpunkt 72,9% TOC abgebaut. In der Phase der Betriebsprobleme sank der TOC bis auf 0,39 g/L ab (■ 6, Abb. 36 A, —), welcher sich auch bis Ende des Versuchszeitraums nicht änderte.

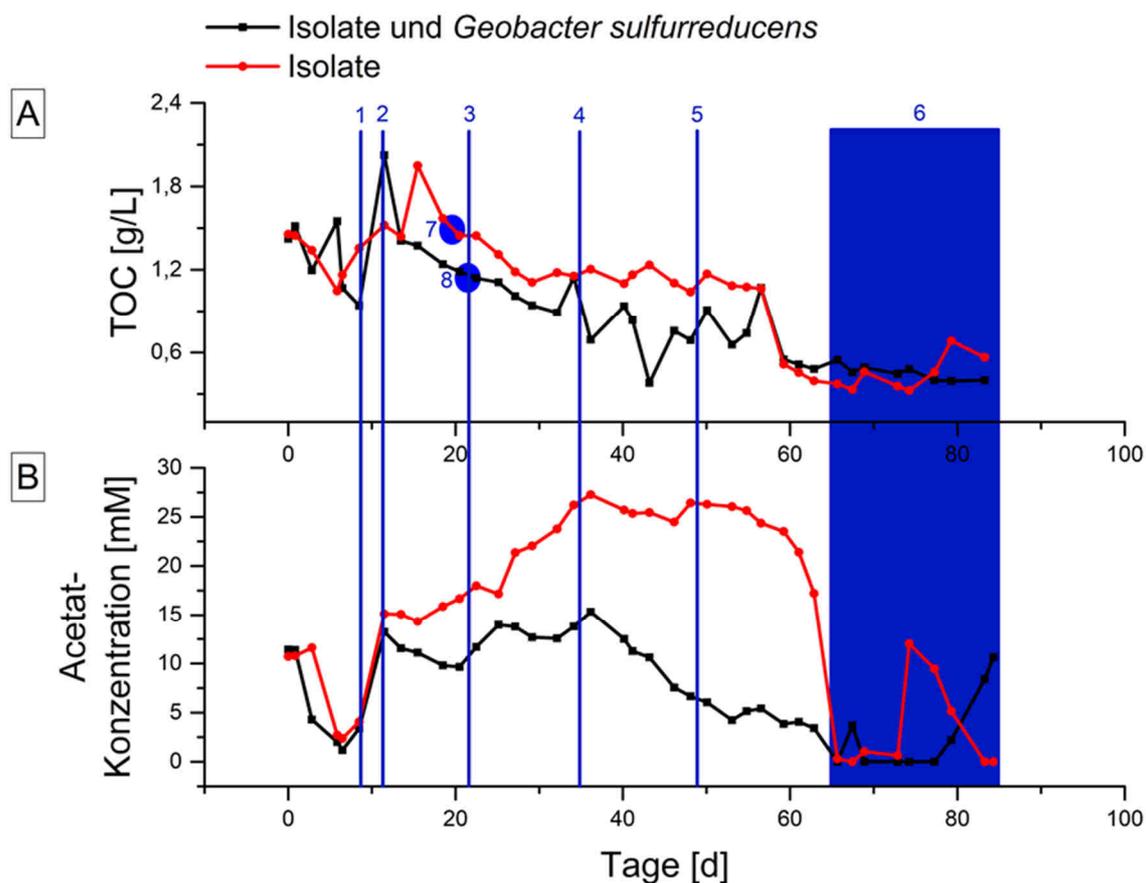


Abbildung 36: TOC und Acetatkonzentration der Ansätze 1 und 2 in der M3C mit hA-Abwasser im Durchflusssystem über 84 Tage. A) Dargestellt ist der TOC in g/L über die Zeit in d von 84 Tagen von Ansatz 1 (—) und Ansatz 2 (—). B) Dargestellt ist die Acetatkonzentration in mM über die Zeit in d von 84 Tagen von Ansatz 1 (—) und Ansatz 2 (—). Zudem zeigen die Markierungen die Ereignisse während des Versuchszeitraums bezogen auf den TOC und die Acetatkonzentration: Anschalten der Pumpe an Tag 9 mit einer Flussrate von 0,015 ml/min, HRT = 12,5 Tage (| 1), Zugabe von Acetat, Laktat und Propionat (| 2), kompletter Austausch des Anodenmediums durch das hA-Abwasser an Tag 21 (| 3), Erhöhung der Flussrate an Tag 35 auf 0,0234 ml/min, HRT = 8 Tage und an Tag 37 auf 0,0293 ml/min, HRT = 6,5 Tage (| 4), Senkung der Flussrate an Tag 49 auf die initiale Flussrate von 0,015 ml/min, HRT = 12,5 Tage (| 5), Betriebsprobleme der Anlage (■ 6), Zeitpunkte für die Berechnung der CE (● 7-8).

Die Berechnung der Coulomb'schen Effizienz wurde für jeden Ansatz für jeweils einen Zeitpunkt während der niedrigen Flussrate von 0,015 ml/min berechnet. Der Zeitraum, der für die Berechnung herangezogen wurde, beläuft sich ausschließlich auf 24 h, da davon ausgegangen werden kann, dass sich der TOC im zu gepumpten hA-Abwasser über den gesamten Messzeitraum verändert und die Konzentration der Substrate nicht konstant bleibt. Zudem ändert sich die Konzentration ebenfalls dann, wenn eine Flasche mit frischem Abwasser für den Zufluss angeschlossen wird (siehe Tab. 35, TOC zu den verschiedenen Entnahme-Zeitpunkten von April 2014 bis März 2016). Für Ansatz 1 mit den aus dem hA-Abwasser isolierten Organismen konnte von Tag 18,5 bis 19,5 eine CE =

23,79% berechnet werden (● 7, Abb. 36 A, —). Dafür wurde angenommen, dass der TOC im zu gepumpten hA-Abwasser 1,99 g/L (siehe Mittelwert Tab. 35) beträgt und bis zu diesem Zeitpunkt 24,12% TOC sowohl im Reaktor, als auch im Zufluss verbraucht wurde. Für den 2. Ansatz mit den Isolaten und dem Laborstamm *G. sulfurreducens* konnte, unter der Annahme von 1,99 g/L TOC im zu gepumpten hA-Abwasser und 41,46% TOC-Verbrauch im Reaktor und im Zufluss bis zu diesem Zeitpunkt, für Tag 20,5 bis 21,5 eine CE = 54,98% ermittelt werden (● 8, Abb. 36 A, —).

Vergleicht man nun die mittlere Stromdichte gemessen im Batch-System der beiden Ansätze mit den Ergebnissen des Durchfluss-Systems, wird deutlich, dass durch das kontinuierliche Zu- und Abpumpen des hA-Abwassers in Ansatz 1 (■) eine Steigerung der mittleren Stromdichte um das 87-fache von 7,6 mA/m<sup>2</sup> auf 656,97 mA/m<sup>2</sup> erzielt werden konnte. In dem Ansatz mit den Isolaten und *G. sulfurreducens* konnte sogar eine 91-fache Steigerung erreicht werden. Hier hat sich die mittlere Stromdichte von 14,89 mA/m<sup>2</sup> auf 1368,25 mA/m<sup>2</sup> erhöht (■, siehe Abb. 37).

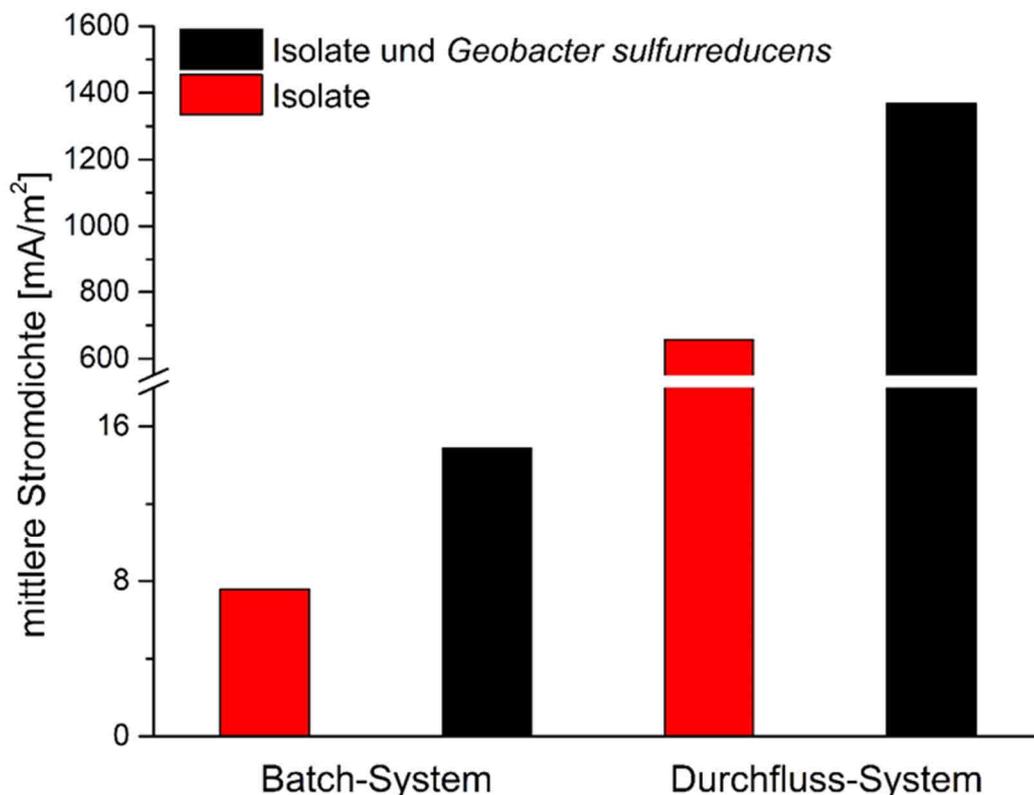


Abbildung 37: Mittlere Stromdichte der Ansätze 1 und 2 im Batch-System und Durchfluss-System der M3C. Aufgetragen ist die mittlere Stromdichte in mA/m<sup>2</sup> des Ansatzes 1 mit den Isolaten (■) im Batch- und Durchfluss-System und die mittlere Stromdichte in mA/m<sup>2</sup> des Ansatzes 2 mit den Isolaten und *G. sulfurreducens* (■) ebenfalls im Batch- und Durchfluss-System.

#### 4.7.2. Ansatz 2 mit pH-Kontrolle im Durchfluss-System für weitere 45 Tage

Nach den ersten 92 Tagen des Durchfluss-Experiments wurde lediglich Ansatz 2 mit den Isolaten und *Geobacter sulfurreducens* weiter untersucht. Hier wurde zunächst das komplette Kathodenkompartiment mit Membran ausgetauscht, da an der Membran des M3C-Reaktors Ablagerungen vorhanden waren und der Protonenaustausch weiterhin gewährleistet werden musste. In Abbildung 38 (—) ist der Strom über die Zeit von 45 Tagen dargestellt. In den ersten 10 Tagen nach dem Austausch wurde das System zunächst ohne die pH-Kontrolle an den Potentiostat angeschlossen und die Stromproduktion überwacht, sodass sich das System von dem Austausch, der unter aeroben Bedingungen stattfand, erholen konnte. In den ersten 2 Tagen blieb die Stromdichte weitestgehend konstant auf ca. 0,15 mA/cm<sup>2</sup> und fiel daraufhin ab auf einen mittleren Wert von 0,12 mA/cm<sup>2</sup> bis Tag 10. An Tag 10 wurde die pH-Kontrolle an das System angeschlossen (| 1, Abb. 38), woraufhin die Stromdichte wieder sank. Bis Tag 20 stieg diese langsam wieder an und lag in dieser Zeit bei einem mittleren Wert von 1,03 mA/cm<sup>2</sup> (| 3, Abb. 38). Auch hier war durch die regelmäßigen, geringen Anstiege der Stromstärke deutlich zu erkennen, zu welchem Zeitpunkt die Pumpe 1 M NaOH dem System zugegeben hatte (↓ 2, Abb. 38). Der Transmitter wurde so programmiert, dass er bei einem gemessenen pH-Wert von 7,0, 1 M NaOH dem Reaktor über die angeschlossenen Pumpen zugegeben wurde und dies stoppte, sobald ein Wert von 7,6 erreicht wurde. In den ersten Tagen wurde der pH-Wert ca. alle 25 h wieder auf 7,6 titriert. Zwischen Tag 20 und 32 war die Stromdichte im Vergleich zu den vorherigen 10 Tagen etwas angestiegen. Im Mittel lag sie bei 0,13 mA/cm<sup>2</sup>. Das Titrationsintervall lag hier bei ca. 50 h (| 4, Abb. 38). Ab Tag 32 bis zum Ende des Versuchs konnte eine mittlere Stromdichte von 0,16 mA/cm<sup>2</sup> erreicht werden. Gegen Ende war eine leicht abfallende Stromdichte zu beobachten. Für den kompletten Versuchszeitraum von 45 Tagen beträgt die mittlere Stromdichte 1302,51 mA/m<sup>2</sup>. Dieser Wert liegt leicht unter dem Wert von 1368,25 mA/m<sup>2</sup> der ersten 92 Tage. Berechnet man nun lediglich den Zeitraum nach Anschluss der pH-Kontrolle (| 1, Abb. 38), erhält man eine mittlere Stromdichte von 1325,17 mA/m<sup>2</sup>. Ab dem Zeitpunkt der Regeneration des Systems an Tag 20 (| 3, Abb. 38) lässt sich eine mittlere Stromdichte von 1437,67 mA/m<sup>2</sup> und ab Tag 32 eine Stromdichte von 1567,29 mA/m<sup>2</sup> berechnen (| 4, Abb. 38).

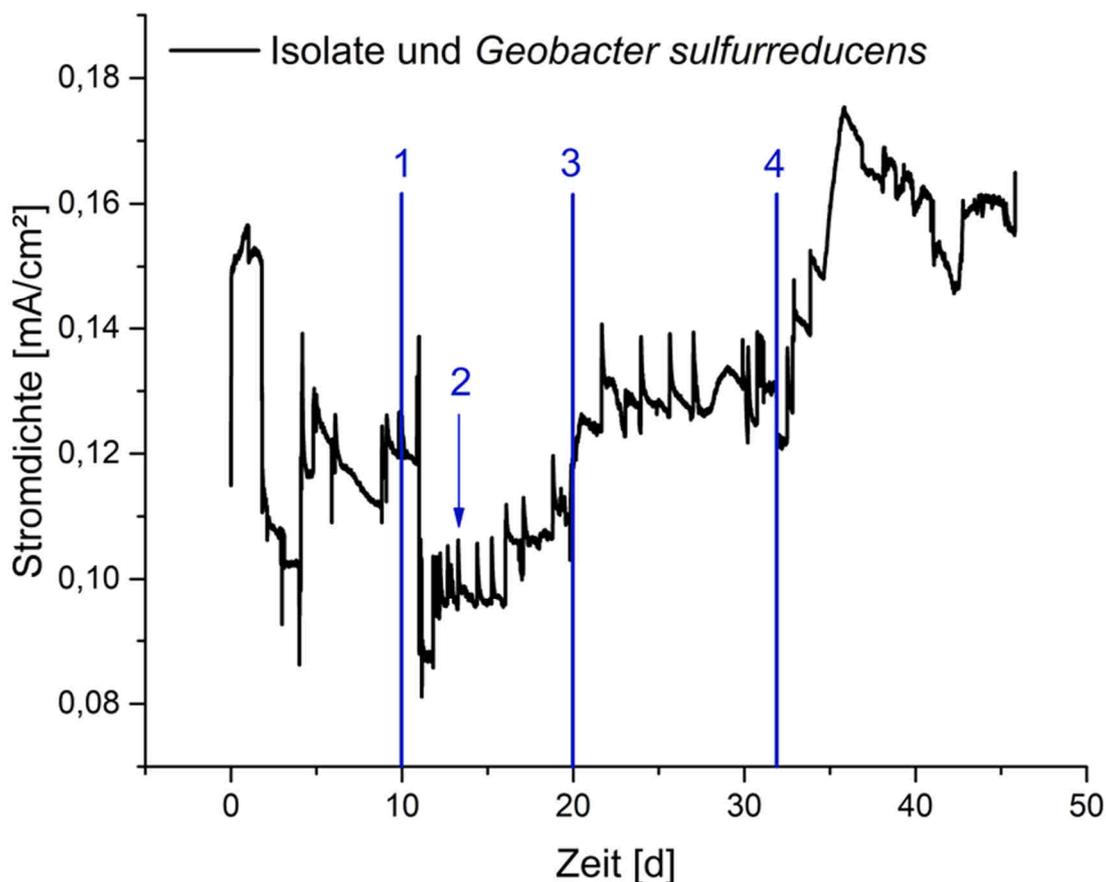


Abbildung 38: Gemessene Stromdichte des 2. Ansatzes in der M3C mit hA-Abwasser im Durchfluss-System über 45 Tage nach dem Austausch des Kathodenkompartiments. Dargestellt ist die Stromdichte in  $\text{mA}/\text{cm}^2$  über die Zeit in d des Ansatzes mit den Isolaten und *G. sulfurreducens* (—). Der Graph zeigt ebenfalls die Ereignisse während des Versuchszeitraumes: Anschließen der automatischen pH-Kontrolle an Tag 10 (| 1), zu pumpen von 1 M NaOH reguliert über den pH-Transmitter (↓ 2), Regeneration des Systems nach Anschluss der pH-Kontrolle an ca. Tag 20 (| 3), Steigerung der mittleren Stromdichte ab Tag 32 (| 4).

Der erste gemessene TOC-Wert (—, Abb. 39) nach dem Austausch des Kathodenkompartiments, zeigte seit dem letzten gemessenen Wert von 0,39 g/L an Tag 84 eine Steigerung auf 0,57 g/L. Zudem stieg der Wert in den ersten 10 Tagen nochmals auf 0,69 g/L an (| 1, Abb. 39). Bis Tag 20 pendelte der TOC zwischen 0,63 g/L und 0,69 g/L (| 2, Abb. 39). Mit der erneuten Steigerung der mittleren Stromdichte ( $0,13 \text{ mA}/\text{cm}^2$ ) bis Tag 32, sank der TOC auf 0,54 g/L (| 3, Abb. 39). Gegen Ende der Laufzeit (Tag 45) stieg dieser wieder auf 0,69 g/L an. Die Abbildung zeigt, dass der Wert über die Zeit relativ konstant blieb und nur gering schwankte. Dies ist ebenso bei der Acetatkonzentration (—, Abb. 39) zu beobachten. Diese blieb bis Tag 27 weitestgehend konstant auf einem mittleren Wert von ca. 6,95 mM. Nach dieser Zeit fiel diese, ebenso wie der TOC, zur Zeit der höheren Stromdichte ab auf einen Wert von 3,5 mM bis 5,0 mM. Gegen Ende des Experiments stieg auch die Acetatkonzentration wieder auf 9,53 mM an. An dieser Stelle wurde das Experiment gestoppt und die Anode aus dem Reaktor entnommen und für verschiedene weiterführende Analysen vorbereitet.

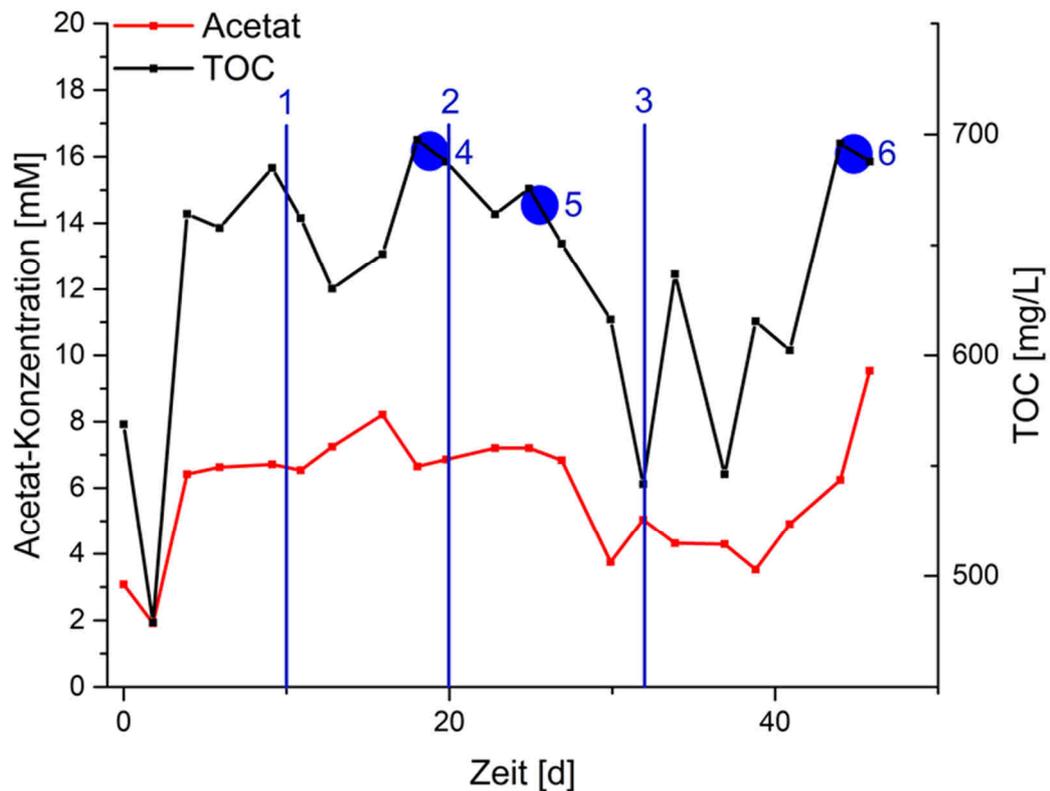


Abbildung 39: TOC und Acetatkonzentration des 2. Ansatzes nach dem Tausch des Kathodenkompartiments in der M3C mit hA-Abwasser im Durchfluss-System über weitere 45 Tage. Dargestellt ist der TOC in g/L (—) und die Acetatkonzentration in mM (—) über die Zeit in d von 45 Tagen des Ansatzes mit *G. sulfurreducens* und den Isolaten. Die Markierungen zeigen die Ereignisse während des Versuchs: Anschluss der pH-Kontrolle an Tag 10 (| 1), Regeneration des Systems nach Anschluss der pH-Kontrolle an ca. Tag 20 (| 2), Steigerung der mittleren Stromdichte ab Tag 32 (| 3), Zeitpunkte für die Berechnung der CE (• 4 - 6).

Auch hier wurde zu verschiedenen Zeitpunkten die Coulomb'sche Effizienz berechnet. Der Zeitraum, der für die Berechnung herangezogen wurde, beläuft sich auch hier ausschließlich auf 24 h. Nach dem Tausch des Kathodenkompartiments kann für diesen Ansatz mit den Isolaten und dem Laborstamm *G. sulfurreducens*, ebenfalls unter der Annahme, dass 1,99 g/L TOC im zu gepumpten hA-Abwasser vorhanden waren, für Tag 18,0 bis 19,0 eine CE = 31,08% ermittelt werden (• 4, Abb. 39, —). Hier wird zudem angenommen, dass bis zu diesem Zeitpunkt sowohl im Zufluss, als auch im Reaktor 65,23% TOC verbraucht wurden. Der zweite Zeitpunkt zwischen Tag 24,9 und 25,9 (• 5, Abb. 39, —), der hier untersucht wurde, weist eine CE = 30,29% auf, unter der Annahme, dass 66,67% TOC-Verbrauch im Reaktor und im Zufluss bis zu diesem Zeitpunkt stattgefunden haben. Zwischen Tag 38,8 und 39,8 wurde, unter der Annahme, dass 69,40% TOC bis zu diesem Zeitpunkt im Reaktor und im zugeflossenen hA verbraucht wurden, eine CE = 43,36% ermittelt (• 6, Abb. 39, —). Diese Erhöhung der CE korreliert mit der, in diesem Zeitraum gemessenen

hohen mittleren Stromdichte von 1567,29 mA/m<sup>2</sup> ab Tag 32 (| 4, Abb. 38). Trotz allem ist die Coulomb'sche Effizienz niedriger, als vor dem Tausch des Kathodenkompartiments, welche von Tag 20,5 auf 21,5 gemessen wurde (CE = 54,98%). Allerdings zeigt die CE gegen Ende der 92 Tage an Tag 59,0 bis 60,0 einen ähnlichen Wert von 41,40%. Mit dem Anschluss der pH-Kontrolle wurde die Leitfähigkeit erneut gemessen. Der messbare Wert des Abwasser-Ausflusses ist von 6,5 mS auf 9,6 mS gestiegen.

Im Anschluss an das Langzeitexperiment wurde auch hier eine FISH-Färbung der Anode aus dem Reaktor des 2. Ansatzes durchgeführt, um zu untersuchen, wie sich der Biofilm im Vergleich zum Batch-System verändert hat (Abb. 40 A - D). In diesen Experimenten wurde *G. sulfurreducens* mit der Geo\_2-Sonde und dem gekoppelten FITC-Fluoreszenzfarbstoff (grün) gefärbt, die Stämme *Clostridium* sp. I und II und *Paenibacillus* sp. mit der LGC\_Firmicutes-Sonde mit Cy5-Fluoreszenzfarbstoff (gelb) und *E. coli* mit der Ent-Sonde, welche Cy3 gekoppelt trägt und rot fluoresziert. Alle Organismen wurden zusätzlich mit DAPI gefärbt (blau). Was auf diesen Bildern deutlich zu sehen ist, ist die Größe der gebildeten Biofilme an und zwischen den Fasern der Anode. In Abb. 40 A wurde die Intensität des Fluoreszenzfarbstoffes FITC herabgesetzt, um die Struktur des Biofilms über die DAPI-Färbung besser darstellen zu können. Dieser Biofilm ist am oberen Ende mit einer Anodenfaser in Kontakt und besteht hauptsächlich aus kleinen *Geobacter*-Zellen. In Abb. 40 B ist die Größe eines solchen Biofilms deutlich zu erkennen. Dieser umwächst nicht nur die Fasern, sondern bewächst auch die Zwischenräume zwischen den einzelnen Anodenfasern. Hier ist deutlich zu erkennen, dass der Biofilm nicht nur aus *Geobacter*-Zellen besteht, sondern auch *E. coli*-Zellen in dem Biofilm vorkommen (rot gefärbte Zellen). Auch in den Bildern C und D sind die Biofilme auf den Fasern dieser Anode dargestellt. Auch hier ist die leicht körnige Struktur durch die kleinen Zellen von *G. sulfurreducens* zu erkennen. Auch hier wird deutlich, dass der Biofilm hauptsächlich aus dem Laborstamm besteht und nur vereinzelt *E. coli* zu finden ist. Die drei anderen Isolate *Clostridium* sp. I, II und *Paenibacillus* sp. sind in den Biofilmen nicht zu finden. Betrachtet man nun die Bilder E und F, welche die Bakterien in der planktonischen Phase des Reaktors zeigt, wird deutlich, dass hier die Firmicutes *Clostridium* sp. I, II und *Paenibacillus* sp. und *E. coli* zu finden sind, jedoch keine *Geobacter*-Zellen. Somit kann zusammenfassend gesagt werden, dass *Geobacter sulfurreducens* auf der Anode große Biofilme bildet, in denen vereinzelt auch *E. coli* vorkommt, jedoch aber nicht in der planktonischen Phase zu finden ist. Die Isolate *Clostridium* sp. I, II und *Paenibacillus* sp. hingegen sind ausschließlich in der planktonischen Phase zu finden, in der auch *E. coli* in größerer Menge, als im Biofilm der Anode, vorkommt. Vergleicht man diese Bilder mit den Bildern aus dem Batch-System, ist zu sehen, dass die ausgebildeten Biofilme deutlich größer

sind und dass man nur wenige Stellen an den Fasern findet, an denen vereinzelt Mikroorganismen in Kontakt mit diesen stehen.

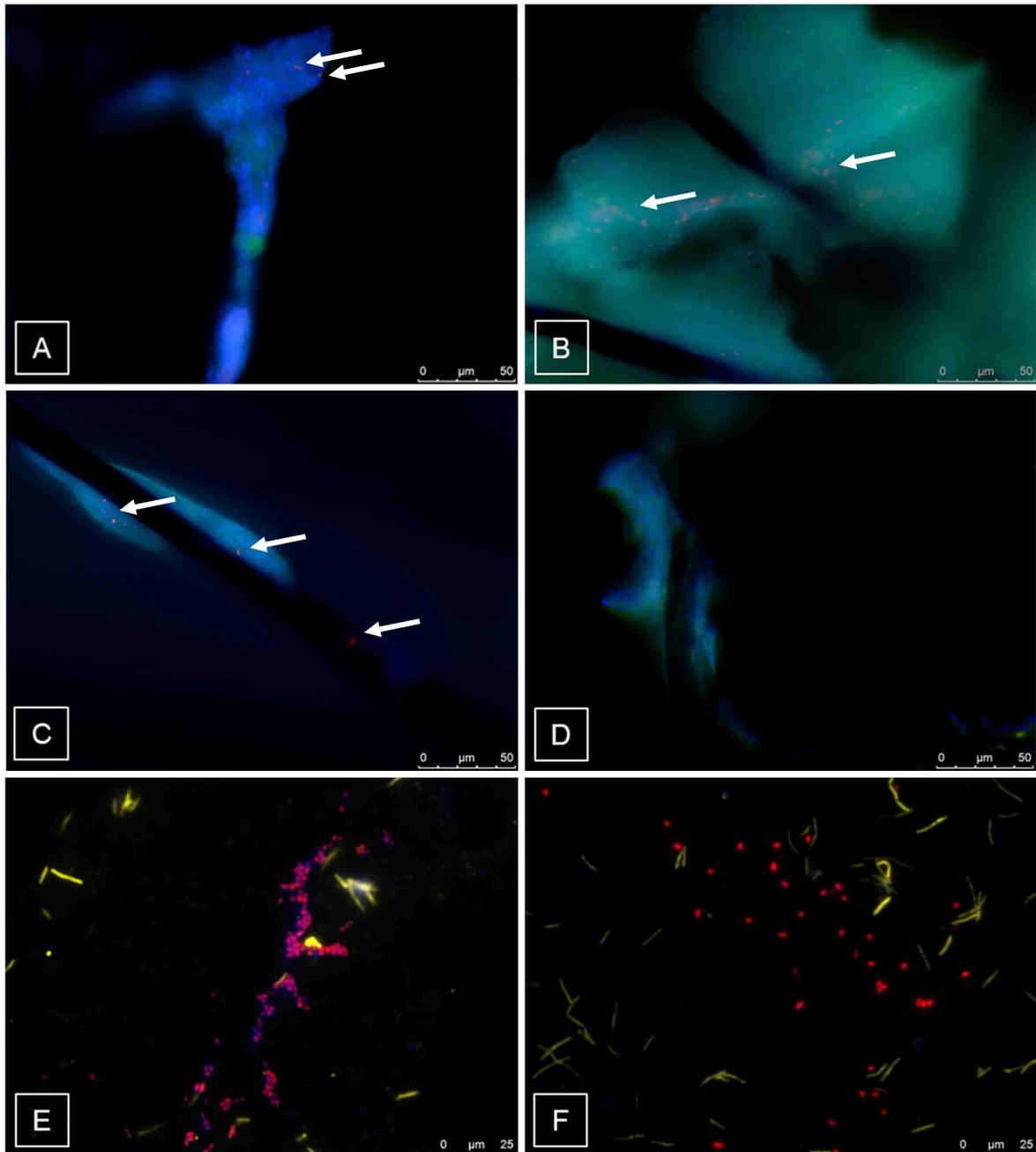


Abbildung 40: FISH-Färbung der Anode und der planktonischen Phase des Ansatzes 2 im Durchfluss-System der M3C. A) bis D) Anode. Die Pfeile zeigen die rot gefärbten *E. coli*-Zellen im Biofilm. E) und F) Planktonische Phase. Färbungen mit DAPI (blau) aller Organismen, Färbung des Laborstamms *G. sulfurreducens* mit der *Geo\_2*-Sonde (grün - FITC-Fluoreszenzfarbstoff), Färbung von *E. coli* mit der *Ent*-Sonde (rot - Cy3-Fluoreszenzfarbstoff) und Färbung der Isolate *Clostridium* sp. I, II und *Paenibacillus* sp. mit der *LGC*-Sonde (gelb – Cy5-Fluoreszenzfarbstoff). Die Bilder sind ein Overlay der Fluoreszenzfarbstoffe. Fluoreszenzmikroskopie mit Dip-In-Objektiv mit 63 x Vergrößerung für die Anoden; Öl-Immersions-Objektiv mit 100 x Vergrößerung für die Flüssigkulturen auf den Slides. Größenbalken 25 µm.

## 4.8. Ermittlung der finalen Zusammensetzung der Organismen auf der Anode

Über die Zugabe von *G. sulfurreducens* zu den Isolaten konnte bereits gezeigt werden, dass die Stromproduktion sowohl im Batch-System, als auch im Durchfluss-System um das doppelte gesteigert werden konnte. Zudem zeigen die FISH-Aufnahmen der Anode, dass der gebildete Biofilm im Durchfluss-System deutlich größer ist, als der auf den Anoden des Batch-Versuchs. Hier werden nicht nur die Anodenfasern bewachsen, sondern auch die Zwischenräume der Anodenfasern. Beim Wechsel des Systems konnte eine Steigerung der Stromproduktion um das 91-fache in dem Ansatz mit dem Laborstamm *Geobacter sulfurreducens* erreicht werden. Mithilfe der qPCR wurde zudem die Zellzahl von *Geobacter* in dem Batch- verglichen mit dem Durchfluss-Experiment ermittelt. In Abbildung 41 ist die produzierte mittlere Stromdichte (■) mit 14,89 mA/m<sup>2</sup> des Batch-Experiments und 1368,25 mA/m<sup>2</sup> des Durchfluss-Experiments dargestellt. Die Umstellung des Systems bringt eine 91-fache Steigerung der Stromdichte. Vergleicht man nun die Zellzahl (■), resultierend aus der qPCR (Effizienz: 99,3%, R<sup>2</sup>: 0,974), so lässt sich eine Zellzahl von 3,16 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml für das Batch-Experiment (Mittelwert aus den 3 Anoden der 3 Reaktoren) und 1,49 x 10<sup>10</sup> Zellen/ml für das Durchfluss-Experiment ermitteln. Somit sind auf der Anode des Durchfluss-Reaktors 5000 x mehr Zellen als auf der Anoden der Batch-Reaktoren, allerdings wird lediglich 91 x mehr Strom produziert.

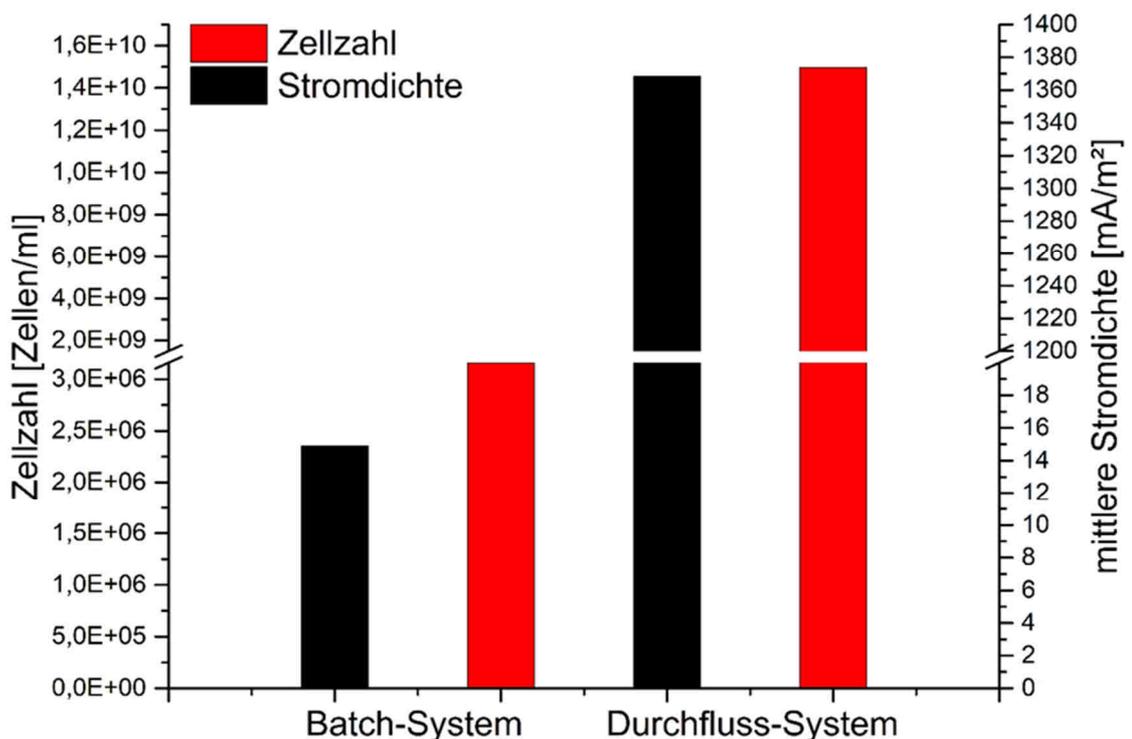


Abbildung 41: Mittlere Stromdichte und Zellzahl von *G. sulfurreducens* des 2. Ansatzes im Batch-System und Durchfluss-System der M3C. Aufgetragen ist die mittlere Stromdichte in mA/m<sup>2</sup> des Ansatzes 2 mit den Isolaten und *G. sulfurreducens* (■) und die über qPCR ermittelte Zellzahl von *G. sulfurreducens* in Zellen/ml der Anoden von Ansatz 2 (■).

Neben der Bestimmung der Zellzahl wurde ebenso die DNA-Konzentration von *G. sulfurreducens* in den Proben der Anoden der Batch-Versuche und des Durchfluss-Versuchs über qPCR ermittelt. Hierbei konnte festgestellt werden dass, lediglich 0,42% (0,043 ng/μl) der Gesamt-DNA (10,14 ng/μl) in den Batch-Versuchen *Geobacter* zuzuordnen ist, aber 73,5% (284 ng/μl) in dem Durchfluss-Experiment (386 ng/μl Gesamt-DNA). Ähnliche Ergebnisse liefert die Metataxonomanalyse. In Abbildung 42 sieht man deutlich, dass im Batch-Experiment (links) mit 58,1% die Familie der *Enterobacteriaceae* (■) dominiert. Die *Paenibacillaceae* (■) sind mit 41,5%, die *Geobacteraceae* (■) mit 0,1% und unbekannte Organismen (andere) (■) mit 0,3% vertreten. Clostridiaceae konnten hier nicht identifiziert werden. Im Durchfluss-Experiment hingegen dominiert die Familie der *Geobacteraceae* (■) deutlich mit 82,7%, wie auch bereits über die qPCR ermittelt. Mit 2,6% sind hier die *Enterobacteriaceae* (■) und mit jeweils 1,3% die *Paenibacillaceae* (■) und *Clostridiaceae* (■) vertreten. Zudem sind Familien, wie *Burkholderiaceae*, *Pseudomonaceae* und *Rhodocyclaceae* unter andere mit 12,1% auf der Anode vertreten (■). In dieser Analyse wurden die Organismencluster lediglich bis auf die Familie bestimmt, um Ungenauigkeiten zu vermeiden.

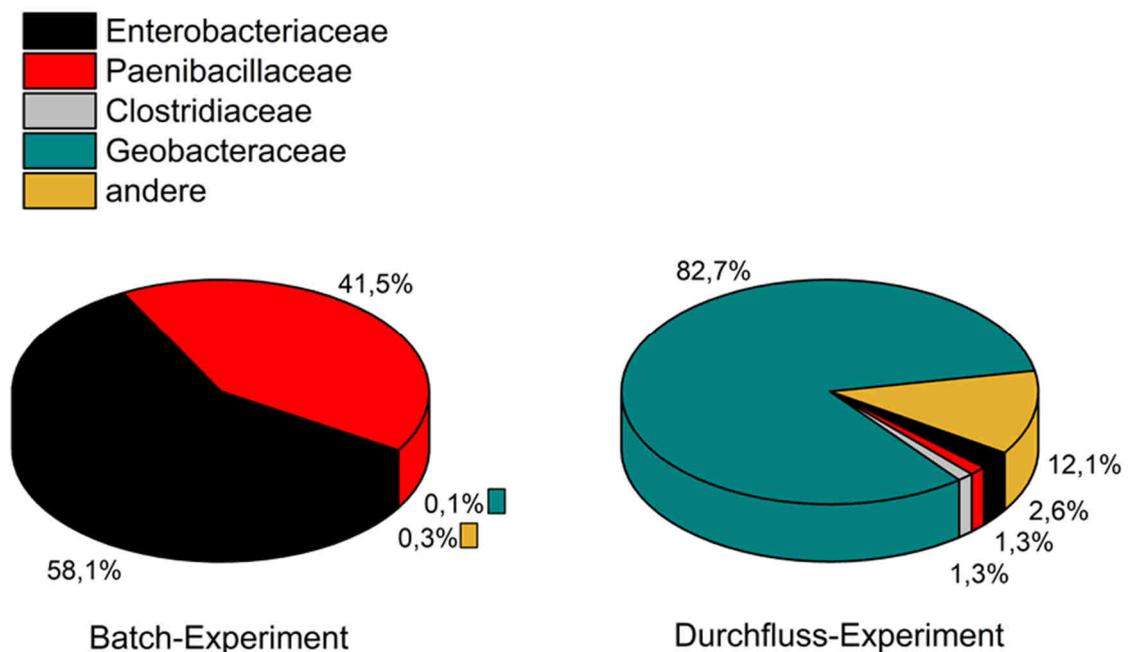


Abbildung 42: Verteilung der Mikroorganismen auf den Anoden des 2. Ansatzes im Batch-System und Durchfluss-System der M3C. Links: Batch-Experiment, rechts: Durchfluss-Experiment. Enterobacteriaceae (■), Paenibacillaceae (■), Clostridiaceae (■), Geobacteraceae (■) und andere (■).

## 4.9. Transkriptomanalyse

Für die nähere Analyse der Adaptation von *G. sulfurreducens* in 75% hA-Abwasser über sechs Generationen und auch der Adaptation an das Abwasser und das M3C-System des Durchflussexperiments über 137 Tage wurde eine Transkriptomanalyse durchgeführt. Hierfür wurde einmal die 6. Adaptationsgeneration mit der 1. Adaptationsgeneration des Wachstumsversuchs miteinander verglichen (6. AG vs. 1. AG) und jeweils das Durchfluss-Experiment (DF) mit der 6. Adaptationsgeneration (DF vs. 6. AG) und der 1. Adaptationsgeneration (DF vs. 1. AG) in 75% hA. Die Ergebnisse der Analyse zeigen in allen drei Fällen eine deutlich stärkere Expression von Genen der Atmungskette, vor allem von NADH-Dehydrogenasen, und des Zentralstoffwechsels (Acetat-Oxidation und Citratzyklus). In Abbildung 43 ist die Expression einiger Gene des Elektronentransfers, des Zentralstoffwechsels, für den Stofftransport aus der Zelle und der zellulären Stressantwort von *G. sulfurreducens* der 6. Adaptationsgeneration im Vergleich zu der 1. Adaptationsgeneration dargestellt. Die Gene *por* (codiert für die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase – GSU0097), *ato-2* (codiert für die Acetyl-CoA-Transferase – GSU0174), *gltA* (codiert für die Citrat-Synthase – GSU1106), *korA* (codiert für die Oxoglutarat-Oxidoreduktase – GSU1468) und *frdB* (codiert für die Fumarat Reduktase/Succinat-Dehydrogenase – GSU1178) beispielsweise sind hier um das 1,8-fache, 4,1-fache, 3,1-fache, 4,5-fache und 5,2-fache in der 6. Adaptationsgeneration im Vergleich zur 1. Adaptationsgeneration stärker exprimiert. *ackA* (codiert für die Acetat-Kinase – GSU2707) hingegen ist um das 1,1-fache schwächer exprimiert (■). Die Gene *nuoA-1* (codiert für die Untereinheit A der NADH-Dehydrogenase – GSU0338), *macA* (codiert für das im Periplasma lokalisierte c-Typ-Cytochrom MacA – GSU0466), *omcZ* (codiert für das an der äußeren Membran lokalisierte c-Typ-Cytochrom OmcZ – GSU2076) und *pilC* (codiert für ein Protein der inneren Membran des Typ IV Pilus PilC – GSU1493) sind um das 5-fache, 1,6-fache, 2,6-fache und das 4,6-fache stärker exprimiert (■). Zudem sind einige Gene für den Stofftransport potentiell toxischer Substanzen aus der Zelle, wie zum Beispiel *GSU0813* (codiert für einen ABC Transporter für organische Lösungsmittel), *GSU2135* und *GSU2136* (codieren für RND Efflux-Pumpen) um das 5,4-fache, 2,5-fache und 4,3-fache stärker exprimiert (■). Hingegen werden in der 6. Adaptationsgeneration im Vergleich zu der 1. Adaptationsgeneration einige Gene für zelluläre Stressantworten niedriger exprimiert. Darunter fallen unter anderem die Gene *GSU2970* (codiert für ein stress-responsive alpha/beta-barrel domain Protein), *sodA* (codiert für die Superoxid-Dismutase – GSU1158), *GSU0191* (codiert für ein cold-shock-Protein) und *usp-4* (codiert für ein universelles Stressprotein) mit 3-fach, 1,6-fach, 1,3-fach und 1-fach niedriger Expression (■). Neben den genannten Genen werden auch Gene für die N<sub>2</sub>-Fixierung und dem Ammoniumtransport verstärkt in der 6. AG im Vergleich zur 1. AG exprimiert, wie bspw. der Ammoniumtransporter *amtB* mit 7,4-

fach stärkerer Expression, oder auch Gene für die Flagellenbildung (nicht in Abb. 43 erfasst).

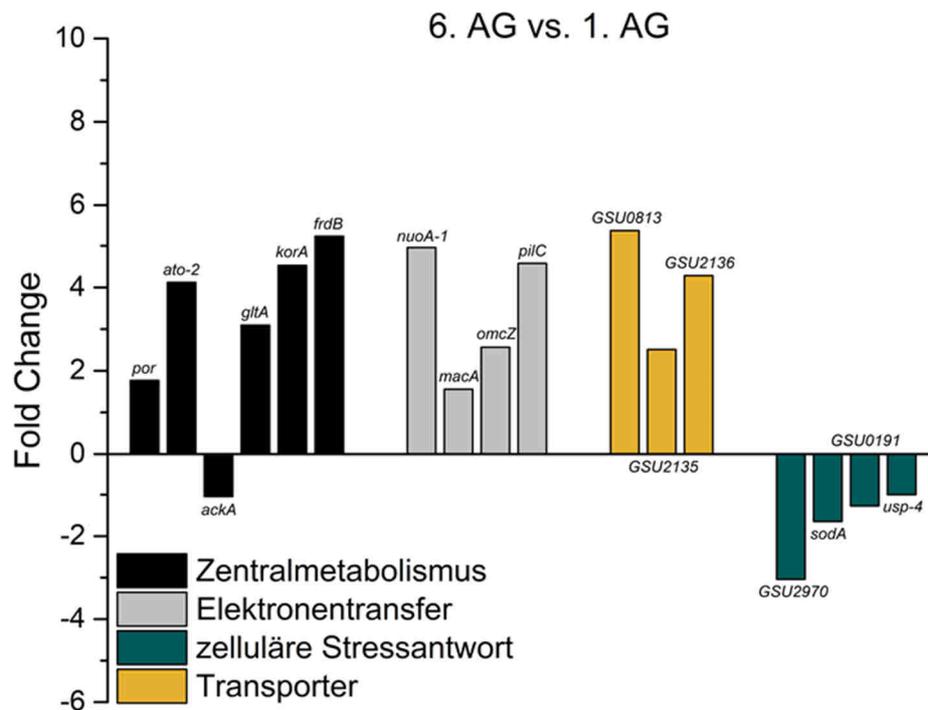


Abbildung 43: Expressionslevel relevanter Gene von *G. sulfurreducens* aus der 6. AG im Vergleich zu der 1. AG der in 75% hA gewachsenen Zellen. Dargestellt sind einige Gene des Zentralmetabolismus (*por*, *ato-2*, *pyc*, *gltA*, *korA*, *frdB* ■), des Elektronentransfers (*nuoA-1*, *macA*, *omcZ*, *pilC* ■), für den Stofftransport (*GSU0813*, *GSU2135*, *GSU2136* ■) und für die zelluläre Stressantwort (*GSU2970*, *sodA*, *GSU0191*, *usp-4* ■). Der Fold Change gibt hierbei die Veränderung des Expressionslevels jedes Gens an.

In Abbildung 44 ist der Unterschied der Expressionslevel zwischen jeweils dem Durchfluss-Experiment und der 6. und 1. AG dargestellt. So zeigen sich auch hier hauptsächlich Gene des Zentralstoffwechsels, wie beispielsweise *por*, *ato-2*, *ackA*, *gltA*, *korA* und *frdB* in der M3C um das 4,2-fache, 3,5-fache, 10,5-fache, 7,7-fache, 3,1-fache und 2,1-fache (■, Abb. 44 A) und auch Gene für den Elektronentransfer, wie *nuoA-1*, *macA*, *omcZ* und *pilC* um das 3,4-fache, 2-fache, 1,7-fache und 2,8-fache stärker exprimiert (■, Abb. 44 A) als in der 6. AG. Zudem sind auch Gene für den Stofftransport, wie *GSU0813*, *GSU2135* und *GSU2136* um das 1,4-fache, 1,4-fache und 3-fache hoch reguliert (■, Abb. 44 A). Auffällig ist hier jedoch, dass einige Gene, welche für die zelluläre Stressantwort codieren, stärker exprimiert werden: *GSU2970*, *sodA* und *GSU0191* sind um das 3-fache, 2,1-fache und 1,6-fache hoch reguliert, wohingegen *usp-4* auch hier schwächer exprimiert wird (2,2-fache) (■, Abb. 44 A). Zudem sind einige Gene für die Flagellenbildung oder Chemotaxis stärker exprimiert.

Vergleicht man nun das Durchfluss-Experiment mit der 1. AG zeigt sich, dass die Gene *por*, *ato-2*, *ackA*, *gltA*, *korA* und *frdB* auch hier um das 7,5-fache, 14,3-fache, 10-fache, 23,8-fache, 13,9-fache und 10,8-fache stärker exprimiert sind (■, Abb. 44 B). *nuoA-1*, *macA*, *omcZ* und *pilC* sind um das 16,9-fache, 3-fache, 7,2-fache und 7,9-fache (■, Abb. 44 B) und *GSU0813*, *GSU2135*, *GSU2136* sind um das 7,8-fache, 3,4-fache und 12,9-fache stärker exprimiert (■, Abb. 44 B). All diese Gene sind damit deutlich stärker exprimiert als im Vergleich DF vs. 6. AG und 6. AG vs. 1. AG. *GSU2970* und *usp-4* sind um das 1-fache und 2,2-fache schwächer exprimiert, wohingegen *sodA* und *GSU0191* jeweils um das 1,2-fache stärker exprimiert werden (■ und, Abb. 44 B). Gene für die Flagellenbildung oder Chemotaxis sind in diesem Vergleich ebenfalls stärker exprimiert.

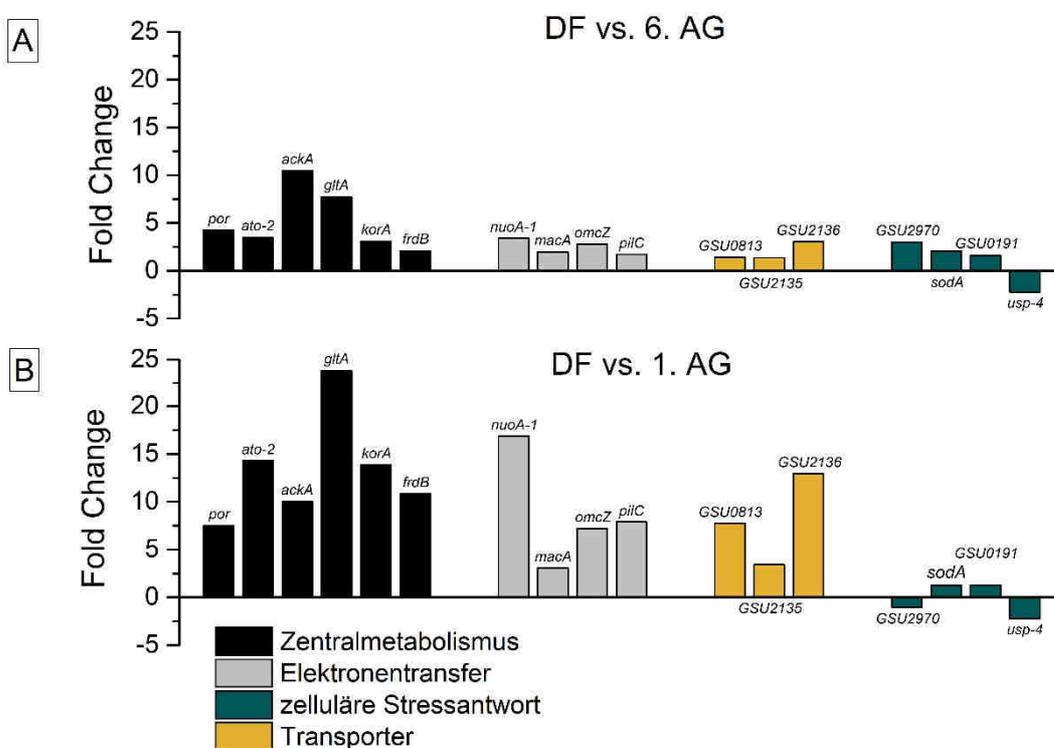


Abbildung 44: Expressionslevel relevanter Gene von *G. sulfurreducens* aus dem Durchfluss-Experiment im Vergleich zu der 6. AG und der 1. AG. A) DF v. 6. AG. B) DF vs. 1. AG. Dargestellt sind Gene des Zentralmetabolismus (*por*, *ato-2*, *pyc*, *gltA*, *korA*, *frdB* ■), des Elektronentransfers (*nuoA-1*, *macA*, *omcZ*, *pilC* ■), für den Stofftransport (*GSU0813*, *GSU2135*, *GSU2136* ■) und für die zelluläre Stressantwort (*GSU2970*, *sodA*, *GSU0191*, *usp-4* ■). Der Fold Change gibt hierbei die Veränderung des Expressionslevels jedes Gens an.

Zudem ist zu sehen, dass im Durchfluss-Experiment mit der Anode als Elektronenakzeptor deutlich mehr Gene, welche für Cytochrome und die TypIV Pili codieren, ein höheres Expressionslevel aufweisen, im Gegensatz zu den Wachstumsversuchen mit Fumarat als Elektronenakzeptor. So sind zum Beispiel *omcE* (GSU0618), *omcM* (GSU2294), *omcC* (GSU2731), *macA* (GSU0466) und

*omcZ* (GSU2076) mit 8,9-facher, 17,1-facher, 18,1-facher, 3-facher und 7,9-facher Expressionszunahme im Durchfluss-Experiment im Vergleich zur 1. Adaptationsgeneration und mit 5-facher, 6,9-facher, 6,3-facher, 1,9-facher und 2,8-facher Expressionszunahme im Vergleich zur 6. Adaptationsgeneration zu detektieren. Bei den TypIV Pili-Genen sind neben *pilC* unter anderem auch *pilX-2* (GSU2034), *pilW-2* (GSU2035) oder *pilY1-2* (GSU2038) um das 7,3-fache, 4,3-fache und 6,8-fache (DF vs. 1. AG), bzw. 7,6-fache, 2,3-fache und 4,1-fache (DF vs. 6. AG) stärker exprimiert. In dem Durchfluss-Experiment sind auch einige Gene, welche für Hydrogenasen codieren, wie *ehrC* (GSU0741) und *hybA* (GSU0783) deutlich stärker exprimiert, als in den Wachstumsversuchen. EhrC bildet zusammen mit anderen Ehr-Proteinen einen Ech-Hydrogenase-ähnlichen Komplex und das Gen ist während der Anodenatmung um das 4,0-fache (DF vs. 1. AG), bzw. 3,2-fache (DF vs. 6. AG) stärker exprimiert. *hybA* codiert für eine Hydrogenase 2 und das Expressionslevel ist um das 5,1-fache (DF vs. 1. AG), bzw. 2,6-fache (DF vs. 6. AG) erhöht, sobald *G. sulfurreducens* Anodenatmung betreibt.

In allen drei Vergleichen (6. AG vs. 1. AG, DF vs. 6. AG und DF vs. 1. AG) konnte der komplette Citratzyklus und die Acetat-Oxidation anhand der höheren Expressionslevel der entsprechenden Gene rekonstruiert werden (Abb. 44 und Tab. 42). Alle Gene sind in allen drei Vergleichen jeweils stärker exprimiert. Eine Ausnahme bilden jedoch *sucD* (DF vs. 6. AG), *ackA* (6. AG vs. 1. AG) und das Acetat-Kinase ähnliche Protein (DF vs. 6. AG), welche leicht schwächer exprimiert werden (Abb. 44 B). Zudem ist zu sehen, dass die stärkste Expression im Vergleich von dem Durchfluss-Experiment mit der 1. AG auftritt.

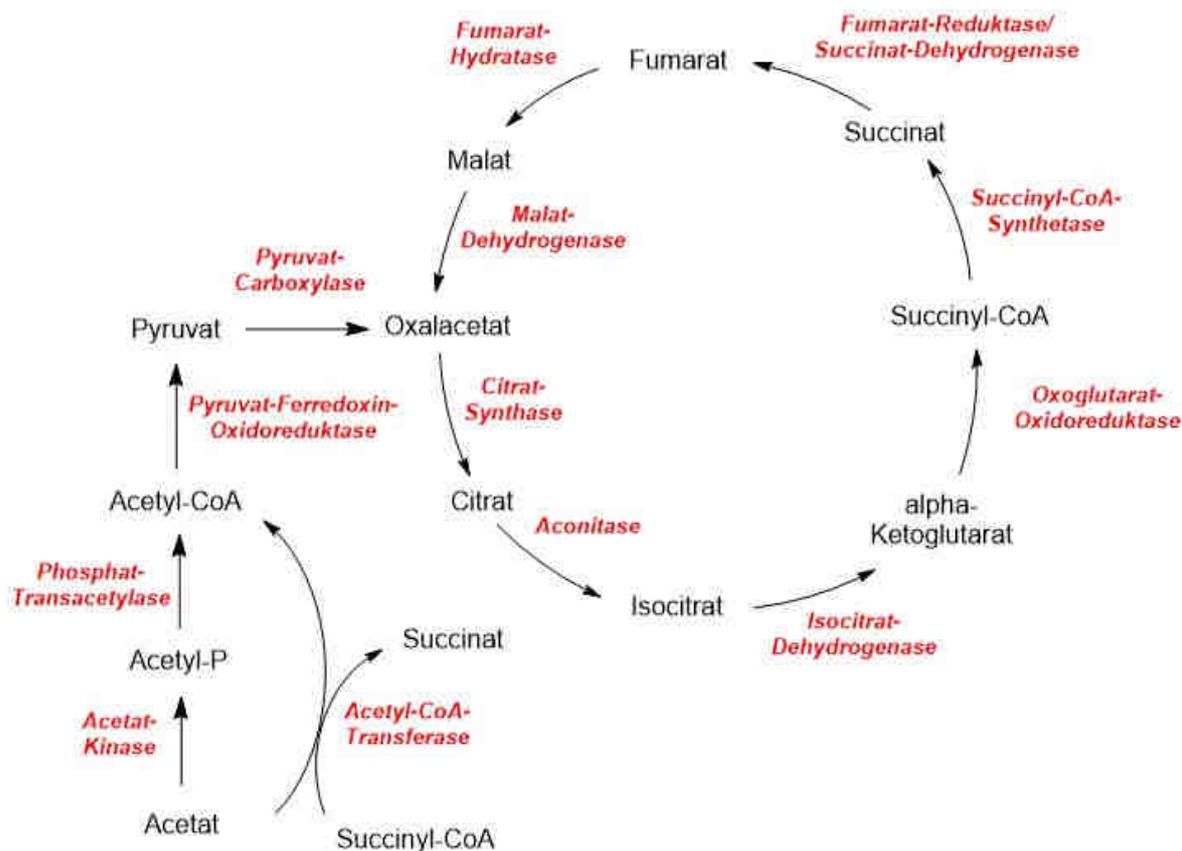


Abbildung 45: Citratzyklus und Acetat-Oxidation von *G. sulfurreducens*. Nachgestellt anhand der stärker exprimierten Gene in DF v. 6. AG, DF vs. 1. AG und & 6. AG vs. 1. AG (nach Mahadevan et al. (2006)).

Tabelle 42: FoldChange der exprimierten Gene des Citratzyklus und der Acetat-Oxidation.

Lokus ID	Gen	Annotation	FoldChange 6. AG vs. 1. AG	FoldChange DF vs. 6. AG	FoldChange DF vs. 1. AG
GSU0097	<i>por</i>	Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase	1,768	4,245	7,505
GSU0174	<i>ato-2</i>	Acetyl-CoA-Transferase	4,121	3,476	14,326
GSU0490	<i>ato-1</i>	Transferase	2,602	9,280	24,147
GSU0994	<i>fumB</i>	Fumarat-Hydratase	4,286	3,732	15,958
GSU1058	<i>sucC</i>	Succinyl-CoA-Synthetase	2,261	1,359	3,073
GSU1059	<i>sucD</i>	Synthetase	3,966	-1,190	3,332
GSU1106	<i>gltA</i>	Citrat-Synthase	3,097	7,698	23,841
GSU1176	<i>frdC</i>	Fumarat-Reduktase/	3,059	5,149	15,750
GSU1177	<i>frdA</i>	Succinat-Dehydrogenase	3,955	3,171	12,541
GSU1178	<i>frdB</i>	Dehydrogenase	5,253	2,059	10,816
GSU1465	<i>icd</i>	Isocitrat-Dehydrogenase	3,114	3,548	10,050
GSU1466	<i>mdh</i>	Malat-Dehydrogenase	4,154	2,385	9,910
GSU1467	<i>korD</i>	Oxoglutarat-Oxidoreduktase	3,782	3,395	12,839
GSU1468	<i>korA</i>	Oxidoreduktase	4,530	3,058	13,855
GSU1469	<i>korB</i>	Oxidoreduktase	5,302	2,254	11,952

GSU1470	<i>korC</i>		5,219	1,667	8,703
GSU2428	<i>pyc</i>	Pyruvat-Carboxylase	2,608	4,118	10,741
GSU2445		Aconitase	2,890	2,799	8,088
GSU2706	<i>pta</i>	Phosphat- Transacetylase	1,192	4,476	5,334
GSU2707	<i>ackA</i>	Acetat-Kinase/ Propionat-Kinase	-1,044	10,477	10,040
GSU3448		Acetat-Kinase ähnliches Protein	2,446	-1,261	1,939

In der Transkriptomanalyse wurde jedoch nicht nur die Anpassung von *G. sulfurreducens* an das Abwasser und das M3C-System untersucht, sondern auch nach möglichen Stoffwechselwegen und Metaboliten der Isolate aus dem Abwasser. Dafür wurden die Sequenzen mit 51 verschiedenen (Schlüssel-)Enzymen verglichen und den unterschiedlichen Organismen zugeordnet. In Tabelle 43 sind alle Proteine aufgelistet, welche über die Analyse des Transkriptoms aus dem Durchfluss-Experiment ermittelt werden konnten. Hier wurden lediglich Proteine mit RPM (reads per million) > 300 näher betrachtet. Zunächst einmal konnten eine Cellulase und eine Cellobiose-Phosphorylase identifiziert werden, welche Cellulose, bzw. Cellobiose zu dem Grundbaustein Glukose abbauen. Das Schlüsselenzym der Glykolyse, die 6-Phosphofruktokinase und einige Enzyme der gemischten Säuregärung, wie die Pyruvat-Formiat-Lyase, zwei Acetat-Kinasen und zwei Formiat-Dehydrogenasen sind ebenfalls mit einer teilweise sehr hohen Anzahl an Reads in der Probe vertreten. Zudem wurden eine Pyruvat-Ferredoxin-Oxireduktase und eine Hydrogenase identifiziert, welche bei der Buttersäuregärung eine Wichtige Rolle spielen. Die im Wood-Ljungdhal-Weg beteiligten Schlüsselenzyme, die CO-Dehydrogenase und Acetyl-CoA-Synthase werden im Durchfluss-Experiment von den Organismen ebenfalls stärker exprimiert. Weiterhin konnte eine Phosphoketolase für den Bifid Shunt, eine Acetolaktat-Synthase für die Butandiol-Synthese, eine Phosphat-Acetyltransferase für die Acetat-Synthese, eine L-Laktat-Dehydrogenase für die Laktat-Synthese, eine Pyruvat-Decarboxylase für die Pyruvat-Oxidation und eine Acetyl-CoA-Synthetase zur Synthese von Acetyl-CoA identifiziert werden. Der Bifid Shunt ist ein glykolytischer Nebenweg für den Glukose-Katabolismus. Einige Enzyme für die anaerobe Respiration, wie die DMSO-Reduktase, die Nitrat- und Nitrit-Reduktase und die L-Laktat-Dehydrogenase zeigen eine hohe Anzahl an RPM, wobei die DMSO-Reduktase mit der L-Laktat-Dehydrogenase für die Laktat-Biosynthese und einer der Formiat-Dehydrogenasen zu den drei Enzymen gehört, welche am häufigsten vorkommen. Zudem konnten zwei Enzyme der Stickland-Gärung gefunden werden, die D-Prolin-Reduktase und eine (R)-2-hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase.

Tabelle 43: Identifizierte Proteine der Isolate aus dem Durchfluss-Experiment. Proteine mit GI-Nummer (Identifikationsnummer, NCBI), RPM (reads per million) und deren zugeordnete potentielle Stoffwechselwege in der syntrophen Lebensgemeinschaft der Organismen.

Protein (GI)	RPM	potentieller Stoffwechselweg
cellulase (510834545) <sup>a</sup>	1139	Zellulose-Abbau
cellobiose phosphorylase (573579109) <sup>c</sup>	726	Zellobiose-Abbau
6-phosphofruktokinase I (85676144) <sup>b</sup>	960	Embden-Mayerhof-Weg
pyruvate formate-lyase protein (1024797169) <sup>d</sup>	5124	gemischte Säuregärung
acetate kinase (190909529) <sup>b</sup>	390	gemischte Säuregärung
acetate kinase (764112765) <sup>c</sup>	726	Acetat-Biosynthese
formate dehydrogenase H, selenocysteine-containing (930359049) <sup>e</sup>	344286	gemischte Säuregärung
formate dehydrogenase, alpha subunit (953087628) <sup>a</sup>	3677	gemischte Säuregärung
pyruvate ferredoxin oxidoreductase (923387097) <sup>a</sup>	976	Buttersäuregärung
hydrogenase (160624920) <sup>a</sup>	368	Buttersäuregärung
carbon monoxide dehydrogenase (300437026) <sup>a</sup>	839	Wood-Ljungdahl-Weg
CO dehydrogenase/acetyl-CoA synthase, acetyl-CoA synthase subunit (308066779) <sup>a</sup>	305	Wood-Ljungdahl-Weg
phosphoketolase (305856304) <sup>c</sup>	599	Bifid-Shunt
acetolactate synthase (917007469) <sup>c</sup>	9680	Butandiol-Biosynthese
phosphate acetyltransferase (738695293) <sup>c</sup>	308	Acetat-Biosynthese
L-lactate-dehydrogenase (336299116) <sup>c</sup>	358753	Laktat-Biosynthese
pyruvate decarboxylase (941132041) <sup>a</sup>	601	Pyruvat-Oxidation
DMSO reductase (612260286) <sup>b</sup>	226761	anaerobe Respiration
L-lactate dehydrogenase (974705824) <sup>b</sup>	775	anaerobe Respiration
nitrite reductase (751402387) <sup>b</sup>	2374	anaerobe Respiration
nitrate reductase (937299854) <sup>b</sup>	4645	anaerobe Respiration
D-proline reductase (800899476) <sup>a</sup>	16861	Stickland-Gärung
(R)-2-hydroxyisocaproyl-CoA dehydratase alpha subunit (75361392) <sup>a</sup>	4399	Stickland-Gärung

a > 50% Identität zu der Proteinsequenz einer Art der Gattung *Clostridium*

b > 50% Identität zu der Proteinsequenz von *E. coli*

c > 50% Identität zu der Proteinsequenz einer Art der Gattung *Paenibacillus*

d > 50% Identität zu der Proteinsequenz einer Art der Gattung *Streptococcus*

e > 50% Identität zu der Proteinsequenz einer Art der Gattung *Campylobacter*

Für die Batch-Experimente wurde ebenfalls RNA isoliert, welche im Anschluss amplifiziert werden musste, da die Konzentration zu gering war. Da die Qualität der RNA nach den angewandten Methoden nicht optimal war, d.h. keine ausreichenden Sequenzlängen erlangt wurden, war der Vergleich mit den (Schlüssel-)Enzymen daher lediglich mit kurzen Domänen möglich, sodass Zufalls-Identitäten nicht ausgeschlossen werden konnten. Somit war eine Normalisierung der Probe in RPM des Batch-Experiments nicht möglich und damit auch nicht der direkte Vergleich mit dem Durchfluss-Experiment. Trotz der schlechten Qualität der Probe konnten alle in Tabelle 43 aufgelisteten Proteine auch in dem Batch-Experiment gefunden werden. Allerdings kann keine Aussage über Quantität der mRNAs getroffen werden.

## 5. Diskussion

### 5.1. Isolierungskampagnen aus den verschiedenen Abwässern

Aus dem kommunalen Abwasser der Emschergenossenschaft und dem industriellen Abwasser der Firma Solvay konnten zu Beginn dieser Arbeit im Laufe der Isolierungskampagnen insgesamt 10 unterschiedliche Mikroorganismen isoliert werden. Der Stamm Em 1, welcher der Gattung *Bacteroides* (Klasse Bacteroidia) zugeordnet werden konnte, wurde aus dem kommunalen Abwasser isoliert. Mit einer Übereinstimmung von 100% wurde dieser als *Bacteroides graminisolvens* identifiziert. Die Gram-negativen, obligat anaeroben Stäbchen sind Bestandteil der Mikroflora des menschlichen Dickdarmes und sind keine Sporenbildner (Manz *et al.*, 1996). Somit ist das Auffinden dieses Organismus in dem kommunalen Abwasser nicht als ungewöhnlich anzusehen. In einer Arbeit von (Nishiyama *et al.*, 2009) konnte *Bacteroides graminisolvens* sp. nov. aus einem Methanogenese-Reaktor zur Verarbeitung von Abfällen einer Rinder-Farm isoliert werden. Das pH- und Temperatur-Optimum dieses Stammes liegt bei ca. 7,2 und 30 - 35°C und er kann verschiedene Zucker, wie Glukose, verstoffwechseln. Die Gram-negativen Stäbchen haben eine Breite von 0,4 – 0,6 µm und eine Länge von 1,2 – 4,5 µm. All diese Eigenschaften stimmen zum Großteil mit denen des Isolates Em 1 überein: *Bacteroides* sp. ist ein Stäbchen mit einer Länge von ca. 2 - 4 µm und einer Breite von ca. 1 µm (Abbildung 16 A). Der Stamm wurde bei pH 7,2 und 37°C unter dem Zusatz von 1% Glukose kultiviert, da er die ursprünglichen Substrate Acetat, Laktat und Propionat im Flüssigmedium nicht verstoffwechseln konnte. Bei der Kultivierung auf den Agar-Platten wurde dem Nährmedium keine zusätzliche Glukose zugegeben. Vermutlich wurde hier der Agar selbst als Zucker-Quelle verwendet. Sowohl aus dem kommunalen, als auch aus dem industriellen Abwasser konnten insgesamt 3 verschiedene Arten der Gattung *Clostridium* isoliert werden. Diese anaeroben Sporenbildner sind Gram-positiv und stäbchenförmig. Durch die Ausbildung von Endosporen sind die Enden meist wie Stecknadelköpfe geformt und verdickt. Ihre Größe variiert mit einer Breite zwischen 0,5 bis 2 µm und einer Länge von bis zu 30 µm (Andreesen *et al.*, 1989). *Clostridien* betreiben Gärung und verstoffwechseln dabei hauptsächlich Kohlenhydrate, wie Cellulose oder Glukose. Die Klasse der *Clostridia* ist weit verbreitet und kommt im Boden, in Sedimenten von Seen und auch im Darmtrakt von Lebewesen vor (Madigan *et al.*, 2008). Die 3 isolierten Stämme *Clostridium* sp. (Em 2), *Clostridium* sp. I (So 1) und *Clostridium* sp. II (So 2), welche am nächsten mit *Clostridium beijernickii* (100% Übereinstimmung), *Clostridium sartagoforme* (99% Übereinstimmung) und *Clostridium butyricum* (99% Übereinstimmung) verwandt zu sein scheinen, weisen alle die typischen Eigenschaften auf, die der Gattung zugeschrieben wird: Sie bilden Endosporen

aus (siehe Abb. 16 B, 17 A und 17 B), die Form und Größe der Stäbchen passt in die oben genannte Größenordnung und sie vergären Glukose. Dem Kulturmedium wurde auch hier 1% Glukose zugeführt, um das Wachstum der drei Stämme zu gewährleisten. Dadurch, dass sie nahezu in allen Lebensräumen vorkommen, ist ihre Isolierung aus den verschiedenen Abwässern ebenfalls nicht ungewöhnlich. Auch dass sowohl aus dem kommunalen und industriellen Abwasser je ein *E. coli*-Stamm isoliert werden konnte ist nicht außergewöhnlich. Sie gehören zu den  $\gamma$ -Proteobacteria und kommen in zahlreichen Lebensräumen, vor allem im Darmtrakt von Lebewesen vor. Der Organismus ist fakultativ aerob und verstoffwechselt eine Reihe von Zucker, Aminosäuren oder organische Säuren (Beg *et al.*, 2007; Madigan *et al.*, 2008). Zudem kann unter anoxischen Bedingungen ebenfalls Citrat mit Hilfe von verschiedenen Cosubstraten verstoffwechselt werden (Bott, 1997). Der Organismus ist mit einer Größe von bis zu 1  $\mu\text{m}$  in der Breite und bis max. 3  $\mu\text{m}$  in Länge relativ klein (Reshes *et al.*, 2008). Die beiden Isolate Em 3 und So 3 zeigen die gleiche Breite, allerdings gibt es Zellen, die länger sind, als in der Literatur beschrieben (hier bis 5  $\mu\text{m}$ ) (siehe Abb. 16 C und 17 C). Der isolierte Organismus Em 4, welcher mit einer 99%-igen Übereinstimmung als *Enterococcus faecium* Verwandter identifiziert wurde, gehört zu der Klasse der *Bacillii*. Die Zellen dieser Gattung sind ovoid und kommen als Einzelzellen oder in Paaren oder kurzen Ketten vor. Sie gehören nicht zu den Sporen-Bildnern und sind Gram-positiv. Sie können sowohl anaerob, als auch aerob leben. Anaerob können diese Bakterien beispielsweise Glukose fermentieren, zudem wurde für einige Arten auch die  $\text{Fe}^{3+}$ -Reduktion beschrieben (Kim *et al.*, 2005a; Schleifer & Kilpper-Balz, 1984). Auch der isolierte Stamm lebt in Form von Ketten (siehe Abb. 16 D), bestehend aus 2 bis 7 einzelnen Kokken. Natürlicherweise ist dieser Organismus ebenfalls in Darmtrakt von Lebewesen zu finden (Devriese *et al.*, 2006) und damit ist es auch hier naheliegend, dass dieser in kommunalem Abwasser zu finden ist. Der aus dem industriellen Abwasser der Firma Solvay isolierte Stamm So 4, zeigt eine 99%-ige Übereinstimmung seiner 16S rRNA mit *Paenibacillus phoenicis* und gehört damit zu der Gattung *Paenibacillus* (Klasse: *Bacilli*). Diese Organismen sind ebenso weit verbreitet, wie die Clostridien und kommen sowohl in Polarregionen, als auch in den Tropen oder aber in aquatischen Lebensräumen oder Wüstenregionen vor. Die Stäbchen gehören zu den fakultativen Anaerobiern und können Endosporen bilden (Grady *et al.*, 2016). Beispielsweise kann der Stamm *P. polymyxa* DSM 365 Glukose anaerob über Fermentation verstoffwechseln (Häßler *et al.*, 2012), allerdings ist *P. phoenicis* sp. nov. beschrieben als aerobes, Gram-positives und bewegliches Bakterium mit einer Größe von 4 – 6  $\mu\text{m}$  Länge und 1 -1,5  $\mu\text{m}$  Breite (Benardini *et al.*, 2011). Das in dieser Arbeit isolierte Bakterium ist jedoch nicht beweglich und ist fakultativ anaerob. Die Zellen sind zudem mit ca. 1  $\mu\text{m}$  Breite und 4 – 10  $\mu\text{m}$  Länge (siehe Abb. 17 D) etwas größer, als von Benardini *et al.* (2011) beschrieben. Für das Wachstum in dem  $\text{Fe}^{3+}$ -Citrat-Flüssigmedium wurde ebenfalls 1% Glukose zugegeben, für das Wachstum auf den Agar-Platten war die Zugabe von Glukose

nicht notwendig. Der aus dem Emscher-Abwasser isolierte Stamm Em 5 *Romboutsia* sp. gehört ebenfalls zu der Klasse *Clostridia*. Mitglieder dieser Gattung sind anaerob und Gram-positiv. Sie sind stäbchenförmig und teilweise leicht gebogen und formieren sich oft zu Ketten (Gerritsen *et al.*, 2014). Die Kettenformation ist ebenfalls bei dem Isolat Em 5 zu beobachten (Abb. 16 E). Auch diese Organismen sind mitunter im Gastrointestinaltrakt von Lebewesen zu finden und daher auch als nicht ungewöhnlich anzusehen, dass er aus dem kommunalen Abwasser der Emschergenossenschaft isoliert werden konnte. Der von Gerritsen *et al.* (2014) beschriebene Stamm der Gattung *Romboutsia* nutzt Glukose als Elektronendonator, bei einem pH-Wert von 7,0 und einer Kultivierungstemperatur von 37°C. Auch für die Kultivierung des Isolates Em 5 wurde dem Medium 1% Glukose (pH 7,2) zugegeben, um dessen Wachstum zu gewährleisten. Die Kultivierung fand ebenfalls bei 37°C statt. Der letzte aus dem Emscher-Abwasser isolierte Stamm Em 6 scheint am nächste verwandt mit *Shewanella putrefaciens* (99% Übereinstimmung) zu sein. Die Gattung *Shewanella* gehört zu den  $\gamma$ -Proteobakterien und diese sind Gram-negativ. Sie können sowohl aeroben, als auch anaeroben Stoffwechsel betreiben und eine Reihe von Elektronenakzeptoren neben O<sub>2</sub> nutzen. Die Stäbchen kommen in vielen aquatischen und terrestrischen Lebensräumen vor und haben eine Länge von 2 – 3  $\mu\text{m}$  und eine Breite von 0,4 – 0,7  $\mu\text{m}$  (Hau & Gralnick, 2007). Es können beispielsweise organische Säuren, wie Laktat anaerob umgesetzt werden (Liu *et al.*, 2001). Der in dieser Arbeit isolierte Stamm ist mit 3 – 9  $\mu\text{m}$  Länge und einer Breite von ca. 1,5  $\mu\text{m}$  teilweise deutlich größer, als in der Literatur beschrieben (siehe Abb. 16 F).

Im Zuge dieser Isolierungskampagnen konnten weitestgehend unterschiedliche Mikroorganismen isoliert werden. Mit *Shewanella* sp. und *E. coli* wurden Organismen der Klasse der  $\gamma$ -Proteobakterien isoliert (Garrity, 2005). Aus der Klasse der *Clostridia* wurden *Romboutsia* sp., *Clostridium* sp. (Em 2), *Clostridium* sp. I (So 1) und *Clostridium* sp. II (So 2) isoliert und *Enterococcus* sp., und *Paenibacillus* sp. aus der Klasse der Bacilli. Diese 6 Organismen gehören zu der Abteilung der Firmicutes (De Vos *et al.*, 2009). Und mit dem Isolat *Bacteroides* sp. konnte ein Organismus der Klasse *Bacteroidia* (Abteilung: Bacteroidetes) isoliert werden (Krieg *et al.*, 2010). Hier bilden die Firmicutes die Mehrheit der Isolate. Eine solche vielschichtige Verteilung der aus Abwasser isolierter Organismen zeigt auch die Zusammenstellung von Wagner & Loy (2002). Die meisten aus Kläranlagen isolierten Organismen gehören zu den  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien und den Bacteroidetes und Actinobacteria. Aber auch Gruppen, wie die Firmicutes und die Nitrospira sind vertreten. Nicht nur über die direkte Isolierung von Mikroorganismen aus Abwasser, sondern auch über die Anreicherung eines mikrobiellen Biofilms auf der Anode einer mikrobiellen Brennstoffzelle konnte die Isolierung verschiedenster Bakterien – mitunter auch Exoelektrogene – erzielt

werden. In einer Arbeit von Kim *et al.* (2004) wurden über die Dauer der Anreicherung in einer MFC von 30 Tagen 25 verschiedene Arten isoliert, welche unter anderem zu den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Proteobacteria und den Firmicutes gehören. Als Inokulum diente hier Abwasser einer Stärkeverarbeitungsfabrik. Diese Isolierung brachte unter anderem das Isolat *Clostridium butyricum* hervor, welches in einer weiteren Arbeit näher untersucht wurde. Hier zeigte sich, dass das Bakterium elektrochemisch aktiv ist (Park *et al.*, 2001). Elektrochemisch aktive Mikroorganismen lassen sich vermehrt unter den  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Proteobakterien und den Firmicutes finden (Logan & Regan, 2006). Viele fermentative Bakterien, wie beispielsweise *Clostridien* galten jedoch immer als nicht-exoelektrogen. Wie bereits erwähnt, konnte aufgezeigt werden, dass auch Clostridien in der Lage sind Elektronen auf eine Anode oder einen löslichen  $\text{Fe}^{3+}$ -Akzeptor zu übertragen. Im Zuge dessen wurden nach den Isolierungskampagnen dieser Arbeit zunächst, die aus dem Solvay-Abwasser isolierten Stämme auf ihre Fähigkeit zur Eisenreduktion getestet. Für diesen und auch alle weiteren Versuche wurden lediglich die Isolate des industriellen Abwassers verwendet. Die Isolate des Emscher-Abwassers wurden in der Dissertation von F. Golisch (2016) benutzt. Alle vier Solvay-Isolate zeigten in den  $\text{Fe}^{3+}$ -Reduktionsassays die Fähigkeit zur Übertragung der Elektronen auf  $\text{Fe}^{3+}$ -Citrat (siehe Abb. 18). *Clostridium sp. I* reduzierte innerhalb von 24 h 38,9 mM  $\text{Fe}^{3+}$ , was der größten Reduktion von allen Isolaten entspricht. Während dieser Zeit reduzierte *Clostridium sp. II* 13,3 mM, *Paenibacillus sp.* 30,3 mM und *E. coli* reduzierte lediglich 3 mM (17,9 mM innerhalb von 12 Tagen). Somit konnte gezeigt werden, dass alle Isolate die Fähigkeit zur Eisenreduktion besitzen. Wie genau die Übertragung stattfindet, ist bisher unklar. Vermutlich nutzen die Organismen das  $\text{Fe}^{3+}$  als Elektronensenke (Dobbin *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2001). Es wird angenommen, dass die Strategie der fermentativen Bakterien zur Nutzung von  $\text{Fe}^{3+}$  als Elektronensenke einen energetischen Vorteil gegenüber der Gärung alleine bedeutet (Lovley, 1991). Wie auch die Clostridien, wird *E. coli* die Fähigkeit zum extrazellulären Elektronentransfer aufgrund der genetischen Ausstattung erst einmal nicht zugesprochen. Doch in dieser Arbeit wird deutlich, dass der Stamm zur Eisenreduktion befähigt ist, wenn auch nicht die Menge an  $\text{Fe}^{3+}$  innerhalb von 24 h reduziert wird, wie bei *Clostridium sp. I*. Für *E. coli* stammen die Elektronen, welche auf  $\text{Fe}^{3+}$  übertragen werden jedoch nicht aus dem Substrat Glukose, da dem Medium bei diesem Assay keine zugegeben wurde. In diesem Versuch nutzt der Organismus Citrat für seinen Gärstoffwechsel (Bott, 1997). In einer dieser Arbeit angegliederten Masterarbeit, konnte S. Atan (2015) zeigen, dass der isolierte Stamm So 3 Citratgärung betreibt und dabei Laktat als Cosubstrat verwendet (Daten sind in dieser Arbeit nicht gezeigt). Dabei werden die freiwerdenden Elektronen aus der Vergärung von Laktat für die Oxidation von Citrat verwendet. Weiterhin wurde angenommen, dass der Organismus das entstehende Acetat im Citratzyklus weiter zu  $\text{CO}_2$  oxidiert, wie von Schauder *et al.* (1986) gezeigt werden konnte. Somit findet eine  $\text{Fe}^{3+}$ -Reduktion im Medium durch *E. coli* statt, allerdings

scheint dies nicht der zentrale Stoffwechselweg für die Energiegewinnung zu sein. Trotz allem hatte der Zusatz des Metalls einen positiven Einfluss auf das Wachstum des Organismus im Vergleich zu dem Medium ohne  $\text{Fe}^{3+}$ . Die Fähigkeit zur Reduktion von  $\text{Fe}^{3+}$  durch das *E. coli*-Isolat So 3 ist kein Einzelfall. Lovley (1991) beschreibt ebenfalls schon sehr früh, die Reduktion von  $\text{Fe}^{3+}$  durch *E. coli*, jedoch sind die genauen Mechanismen bisher weitestgehend ungeklärt. Bisher konnte zudem gezeigt werden, dass *E. coli* ebenfalls in der Lage ist, Elektronen auf eine Anode zu übertragen, wobei Elektronenmediatoren, wie Hydroxylquinon-Derivate eine Rolle zu spielen scheinen und durch Porine in der Membran der Transport aus der Zelle gewährleistet wird (Liu *et al.*, 2012; Yong *et al.*, 2013).

## 5.2. Wachstumsversuche mit *Clostridium sp. I*

In dieser Arbeit wurde im Anschluss der Stamm *Clostridium sp. I* aufgrund seiner Reduktions-Leistung innerhalb der 24 h näher untersucht. Wie in den Ergebnissen dargestellt, wurde das Wachstum des Stammes zum einen in einem Medium mit 50 mM Glukose und 40 mM  $\text{Fe}^{3+}$ -Citrat getestet (Respirations-Versuch) und zum anderen zum Vergleich in einem Medium mit ausschließlich 50 mM Glukose (Gärungs-Versuch) (siehe Abb. 19). Der Stamm war auch hier in der Lage das  $\text{Fe}^{3+}$  zu reduzieren: Nach 12,5 h wurden bereits 38,03 mM reduziert und nach 24 h waren 39,4 mM von ursprünglich 40 mM  $\text{Fe}^{3+}$  reduziert. Die Reduktion zeigte sich während der kompletten Wachstumsphase des Organismus. Im Vergleich dazu, wird in dem Gärungs-Versuch deutlich, dass durch die Zugabe von  $\text{Fe}^{3+}$  das Wachstum gefördert wird. Es wird eine größere Zelldichte, innerhalb einer kürzeren Zeit erreicht. Nach 12,5 h ist eine  $\text{OD}_{655} = 3,3$  erreicht, wohingegen der Stamm, welcher ausschließlich Gärung betreibt, lediglich eine  $\text{max. OD}_{600} = 1,74$  nach 24 h erreicht. Zudem fördert  $\text{Fe}^{3+}$  den Eintritt in die log-Phase von *Clostridium sp. I*. Der Stamm im Gärmedium benötigt 7 h bis zum Erreichen der log-phase, wohingegen im Medium mit  $\text{Fe}^{3+}$ -Zusatz diese bereits nach ca. 3 h erreicht. Dieses verstärkte Wachstum unter  $\text{Fe}^{3+}$ -Bedingungen zeigt sich auch deutlich in der Verdopplungszeit des Stammes:  $t_d = 35,5$  min im Vergleich zu 71,1 min im Gärungs-Versuch. Jedoch konnte im Zuge dieser Arbeit nicht geklärt werden, ob nicht auch das Citrat durch den Stamm vergärt wird. Trotz allem konnten ähnliche Ergebnisse auch in den Stämmen *Clostridium butyricum* EG3 und *Clostridium beijernickii* gezeigt werden (Park *et al.*, 2001; Dobbin *et al.*, 1999). Es kann also angenommen werden, dass *Clostridium sp. I*  $\text{Fe}^{3+}$  als Elektronensenke nutzt. Wie bereits erwähnt, geht man davon aus, dass dieser Weg einen energetischen Vorteil gegenüber der Gärung alleine bringt. Dobbin *et al.* (1999) konnten die Aktivität einer NAD(P)H-abhängigen Fe(III)-Reduktase aufzeigen, welche an der Membran des Bakteriums lokalisiert ist. Diese Erkenntnis lässt darauf schließen, dass die Kopplung der Oxidation von NAD(P)H und der Reduktion von  $\text{Fe}^{3+}$  die Bereitstellung von NAD(P)<sup>+</sup> fördert und damit die

Synthese von ATP während der Gärung. Es wurde zudem beobachtet, dass sich die Bilanz der Gärung und das Produktspektrum mit der Zugabe und der  $\text{Fe}^{3+}$ -Konzentration verändert, es entstanden weniger reduzierte Gärungsprodukte, als ohne den Zusatz der Kationen. Die Veränderung des Produktspektrums zwischen reiner Gärung und fermentativer  $\text{Fe}^{3+}$ -Reduktion kann auch in dem Experiment mit *Clostridium* sp. I beobachtet werden. Die vollständige Gärungsbilanz konnte hier allerdings nicht ermittelt werden, jedoch wurden mittels HPLC die organischen Säuren Acetat und Butyrat und deren Konzentrationen während der Wachstumsversuche gemessen. Das Produktspektrum im Respirations-Versuch verschiebt sich hier Richtung Acetat, wohingegen im Gärungs-Versuch das Spektrum von Butyrat und Acetat recht ähnlich ist, aber deutlich mehr Butyrat produziert wird, als bei der fermentativen  $\text{Fe}^{3+}$ -Reduktion. Dies wird sichtbar in den in Tabelle 37 aufgelisteten Ausbeuten der Produkte pro mol Glukose: In dem Gärungsversuch entsteht pro mol Glukose 0,31 mol Acetat und 0,28 mol Butyrat. Bei Zugabe von  $\text{Fe}^{3+}$  hingegen entstehen 0,43 mol Acetat, aber nur 0,18 mol Butyrat pro mol Glukose. In Anwesenheit des Elektronenakzeptors wird also deutlich mehr Acetat produziert als Butyrat. Unter der Annahme, dass bei der fermentativen  $\text{Fe}^{3+}$ -Reduktion von *Clostridium* sp. I das  $\text{Fe}^{3+}$  ebenfalls als Elektronensenke genutzt wird, kann man davon ausgehen, dass die Vergärung von Glukose zu Acetat dem Organismus einen energetischen Vorteil bringt. Zieht man die unterschiedlichen Wege der Glukosevergärung in Clostridien zu den Gärungsprodukten Acetat und Butyrat in Betracht, so wird deutlich, dass bei der Produktion von Acetat Acetyl-CoA über Acetylphosphat unter Bildung von 1 ATP zu Acetat umgewandelt wird. Wird Butyrat produziert, kommt es über mehrere Zwischenschritte zur Produktion von Butyrat und 1 ATP aus 2 Acetyl-CoA. Zudem findet hier die essentielle Reoxidation von NADH/ $\text{H}^+$  statt (Madigan *et al.*, 2008). Bei Zugabe von  $\text{Fe}^{3+}$  wird in diesem Experiment allerdings die Vergärung der Glukose zu Acetat bevorzugt. Dies könnte in dem schnelleren Weg zur Energieerzeugung von lediglich einem Acetyl-CoA über Acetylphosphat zu Acetat und ATP begründet sein, wenn man zudem annimmt, dass die Reduktionsäquivalente NAD(P)H über eine NAD(P)H-abhängigen Fe(III)-Reduktase unter Übertragung der Elektronen auf  $\text{Fe}^{3+}$  reoxidiert werden, wie von Dobbin *et al.* (1999) gezeigt hat. Demnach wäre die Vergärung von Glukose über deutlich mehr Zwischenprodukte zu Butyrat nicht notwendig. Zudem wird so viel Energie mit dieser Art der Fermentation gewonnen, dass *Clostridium* sp. I seine Wachstumsrate und -ausbeute verdoppeln konnte. Dies sind lediglich Annahmen, die aufzeigen könnten, warum *Clostridium* sp. I die fermentative  $\text{Fe}^{3+}$ -Reduktion bevorzugt. Genauere Mechanismen sind nicht bekannt und konnten im Zuge dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden. Auch ist bisher unklar, ob der Organismus nicht zusätzlich Citrat, ähnlich wie *E. coli* vergärt. Dies bedarf weiterer Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit aus Zeitgründen nicht durchgeführt werden konnten.

Als Zusatz zu den Wachstumsversuchen und dem Reduktionsassay wurde die elektrochemische Aktivität von *Clostridium* sp. I in der M3C getestet. Hier sollte festgestellt werden, ob der Organismus auch fähig ist, Elektronen auf einen anderen Elektronenakzeptor, eine Anode, zu übertragen und dies dem Stamm ebenfalls einen energetischen Vorteil bringt. In der Literatur sind wenige Gram-positive Organismen bekannt als Exoelektrogene (Zhang *et al.*, 2012) In diesem Versuch wird deutlich, dass *Clostridium* sp. I nicht in der Lage ist, bei einem Potential von 0 mV vs. NHE (-199 mV vs. Ag/AgCl), Elektronen auf die Anode zu übertragen. Das Potential von  $\text{Fe}^{3+}$  liegt bei 0,77 V (Madigan *et al.*, 2008) und liegt damit höher als das von dem angelegten Potential an der Anode. Vermutlich kann der Stamm daher seine Elektronen bevorzugt auf  $\text{Fe}^{3+}$  übertragen, im Gegensatz zu der Anode. So müsste man das Anodenpotential erhöhen, um möglicherweise eine Übertragung von Elektronen zu erzielen. Wie in der Einleitung erwähnt, gibt es verschiedene Möglichkeiten, Elektronen auf eine Anode zu übertragen: zum einen über direkten Kontakt zu dem unlöslichen Akzeptor oder zum anderen über Mediatoren oder Nanowire. Trotz des Ergebnisses zur Stromproduktion in der M3C könnte der Stamm die Fähigkeit besitzen, Elektronen nach außen auf eine Anode zu übertragen. Viele Organismen nutzen Mediatoren und Nanowire um genau solche Distanzen zu überwinden. Somit stellt sich hier die Frage, ob auch *Clostridium* sp. I die Fähigkeit besitzt, beispielsweise über Mediatoren, wie Flavine oder aber auch Phenazine (Schröder *et al.*, 2015) Elektronen auf einen externen Elektronenakzeptor zu übertragen. In einer Arbeit von Dalla Vecchia *et al.* (2014) konnte erstmals gezeigt werden, dass ein Gram-positiver Organismus endogene Mediatoren für den Elektronentransfer produziert. *Desulfotomaculum reducens* nutzt höchstwahrscheinlich Riboflavin, um extrazelluläre Elektronenakzeptoren, wie  $\text{Fe}^{3+}$ -Citrat oder  $\text{Fe}^{3+}$ -Oxide zu reduzieren (Dalla Vecchia *et al.*, 2014). Neben solchen endogenen Mediatoren gibt es auch exogene Mediatoren, welche von Bakterien genutzt werden können, um Elektronen zu übertragen, wie zum Beispiel synthetische Mediatoren (Neutralrot) (Zhang *et al.*, 2006) oder aber auch natürlich vorkommende Substanzen, wie Huminstoffe (Roden *et al.*, 2010). Eventuell ist es *Clostridium* sp. I auch möglich entweder einen endogenen Mediator zu synthetisieren oder einen exogenen Redoxmediator zu nutzen, um Elektronen übertragen zu können. Jedoch konnte auch dies im Zuge dieser Arbeit nicht geklärt werden.

### 5.3. M3C mit hA-Abwasser im Batch

Nachdem mit Hilfe der  $\text{Fe}^{3+}$ -Reduktionsassays aufgezeigt werden konnte, dass alle Isolate in der Lage sind,  $\text{Fe}^{3+}$  zu reduzieren, sollte deren Fähigkeit zur Stromproduktion in Form einer Mischkultur aller Isolate getestet werden. Zudem wurden 2 weitere Ansätze zum Vergleich getestet:

- (1) Ansatz 1: Isolate (*Clostridium* sp. I, *Clostridium* sp. II, *Paenibacillus* sp., *E. coli*)
- (2) Ansatz 2: Isolate (*Clostridium* sp. I, *Clostridium* sp. II, *Paenibacillus* sp., *E. coli*) und der Laborstamm *G. sulfurreducens* (Barcode)
- (3) Ansatz 3: Laborstamm *G. sulfurreducens* (Barcode)

Alle 3 Ansätze wurden zunächst in einem Batch-Verfahren getestet, indem das Anodenkompartiment mit Abwasser befüllt und die Leistung bezüglich Stromproduktion und Abnahme der Substrate untersucht wurde. Der Laborstamm *G. sulfurreducens* ist, wie in der Einleitung erwähnt, ein Modelorganismus bezüglich der Stromproduktion in mikrobiellen Brennstoffzellen. Der Organismus ist in der Lage anaerob Acetat zu metabolisieren (Méthé *et al.*, 2003), was aufgrund der hohen Acetatfracht in dem Abwasser der Firma Solvay, den optimalen Organismus zur Aufbereitung dieses Abwassers darstellt. Acetat ist zudem ein einfaches Substrat, welches als Endprodukt vieler Gärungsstoffwechsel aus Glukose oder anderen komplexeren Molekülen entsteht (Santoro *et al.*, 2017). Es wurde ebenfalls als geeigneteres Substrat für die Stromproduktion in MFC im Vergleich zu Glukose, Propionat oder Butyrat getestet (Chae *et al.*, 2009). Daher wurde in einem zweiten Ansatz die Leistung der Isolate und *G. sulfurreducens* zusammen in der M3C getestet. Im dritten Ansatz wurde dann die Leistung des Laborstammes alleine untersucht. Zu diesen drei Ansätzen wurde eine Negativkontrolle, welche nicht-inokuliertes hA-Abwasser enthielt, getestet, um sicherzustellen, dass das Abwasser an sich keinen Einfluss auf die Stromproduktion hat, was in Abbildung 26 (—) und 28 B deutlich sichtbar wird. Für alle Experimente wurde steril-filtriertes hA-Abwasser benutzt. In Abbildung 26 wird deutlich, dass sowohl in Ansatz 1, als auch in Ansatz 2 die größte Stromdichte in der ersten Woche erreicht wird. Nachdem Austausch des Abwassers an Tag 7 und 14 wurde in der darauffolgenden Woche immer weniger Strom produziert. Das Abwasser wurde jede Woche ausgetauscht, um sicherzustellen, dass die Organismen an der Anode mit Substrat versorgt sind. Dieser Unterschied der Stromdichte könnte darin begründet sein, dass mit jedem Abwasseraustausch, Bakterien aus der planktonischen Phase der Brennstoffzelle aus dem System entfernt wurden und damit weniger Bakterien an der Stromproduktion beteiligt waren. Vergleicht man Ansatz 1 und Ansatz 2, lassen sich möglich Rückschlüsse auf die Aufgaben der einzelnen Organismen im System ziehen. Wie bereits erwähnt, gehören die isolierten Stämme zu den fermentierenden Organismen, was bedeutet, dass diese bevorzugt Substrate vergären. 56,93% des gesamt TOC entsprechen der Acetatkonzentration von 47,2 mM in dem Abwasser, was bedeutet, dass 43,07% TOC in Form von unbekanntem Substraten darin enthalten ist. Da das Chemieunternehmen mitunter Polymerwerkstoffe aus Celluloseacetat herstellt, kann man davon ausgehen, dass neben Acetat, welches *G. sulfurreducens* als Substrat dient, auch Substrate in dem Abwasser enthalten sind, die den Isolaten als Gärstoffe dienen. Betrachtet man die Stromkurve von Ansatz

1, indem nur die Isolate getestet wurden, kann man annehmen, dass nur so lange Strom produziert wird, solange den Isolaten Substrat zur Verfügung steht (—, Abb. 26). Ab Tag 2,5 sinkt dieser kontinuierlich, bis das Abwasser das erste Mal getauscht wird. Erst dann stehen den Isolaten wieder Metabolite zur Verfügung. Jedoch kann die Stromdichte der ersten Woche nicht wieder erreicht werden, da nach dem Austausch des Abwassers weniger Organismen im System verblieben sind. Das gleiche zeigt sich in der dritten Woche nach abermaligem Austausch des Abwassers. Ansatz 2 zeigt ähnliche Ergebnisse, mit dem Unterschied der höheren Stromproduktion. Dies kann durch die Zugabe des Laborstammes *G. sulfurreducens* begründet sein. Der exoelektrogene Organismus ist in der Lage, das Acetat aus dem Abwasser zu oxidieren und die Elektronen auf die Anode zu übertragen. Allerdings sinkt auch hier der Strom zu gleichen Zeit, wie in Ansatz 2, was vermuten lässt, dass die Leistung von *G. sulfurreducens* in irgendeiner Form abhängig von dem Metabolismus der Isolate sein muss. Bei der Oxidation von Acetat entsteht zunächst Acetyl-Phosphat und dann Acetyl-CoA. Die Synthese zu Pyruvat erfordert im nächsten Schritt die Bindung von CO<sub>2</sub> über die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (Mahadevan *et al.*, 2006). Da das System der M3C jedoch für die Aufrechterhaltung der anoxischen Bedingungen lediglich mit N<sub>2</sub> begast wird, muss der Laborstamm das notwendige CO<sub>2</sub> aus dem Gärstoffwechsel der Isolate beziehen, welches als Beiprodukt entsteht (Madigan *et al.*, 2008). Geht man nun davon aus, dass die Isolate, ähnlich wie in Ansatz 1 nur so lange Substrate metabolisieren können und demnach auch CO<sub>2</sub> produzieren, wie geeignetes Substrat vorhanden ist, bricht mit dem Stoffwechsel der Isolate ab Tag 2,5 auch der Stoffwechsel von *G. sulfurreducens* zusammen. Daraus folgt, dass kein Strom mehr produziert werden kann (—, Abb. 26). Somit könnten die Isolate in der M3C zusammen mit dem Laborstamm eine Art Helfer-Funktion haben, indem sie komplexere Substrate zu einfacheren Substraten, wie Acetat und CO<sub>2</sub>, metabolisieren, welches dann *G. sulfurreducens* zur Verfügung steht (Ren *et al.*, 2007). Durch den Austausch des Abwassers werden auch hier viele Organismen aus dem System entfernt und die produzierte Stromdichte der ersten Woche kann in den darauffolgenden Wochen nicht annähernd erreicht werden. Diese ist vergleichbar zu den produzierten Stromdichten des ersten Ansatzes. Somit lässt sich eine mittlere Stromdichte über die Zeit von 21 Tagen von 7,56 mA/m<sup>2</sup> für Ansatz 1 mit den Isolaten und 14,89 mA/m<sup>2</sup> für Ansatz 2 mit den Isolaten und dem Laborstamm *G. sulfurreducens* errechnen. Was auf den ersten Blick deutlich zu sehen ist, ist, dass mit der Zugabe des Laborstammes zu den Isolaten die Stromdichte verdoppelt werden konnte. Betrachtet man die Acetatkonzentration und den TOC in den beiden Ansätzen über die Zeit, zeigt Ansatz 1 sehr deutlich, dass die Isolate Gärung betreiben, da hier ein Anstieg von Acetat zu verzeichnen ist (—, Abb. 27). Im Durchschnitt steigt dieser um 3,73% (bezogen auf 36 cm<sup>2</sup> Anodenfläche) pro Woche an. Im Vergleich dazu kann in Ansatz 2 keine wirkliche Abnahme oder Zunahme der Konzentration von Acetat beobachtet werden, die Werte fluktuieren recht stark und zeigen keinen eindeutigen Trend (—, Abb. 27).

Dies könnte darin begründet sein, dass die Produktion von Acetat durch die Organismen und die Oxidation durch *Geobacter* sehr ungleichmäßig verläuft. Es scheint, als ob die Isolate mehr produzieren, als *G. sulfurreducens* verstoffwechseln kann. Der TOC zeigt in beiden Ansätzen eine geringe Abnahme (— und —, Abb. 27). Mit hochgerechnet 70,37 g/L pro Woche und m<sup>2</sup>, was 12% TOC-Abnahme in einer Woche im Mittel (bezogen auf 36 cm<sup>2</sup> Anodenfläche) entspricht, wird in Ansatz 2 mit *G. sulfurreducens* mehr als doppelt so viel TOC abgebaut, wie in Ansatz 1 mit 30,6 g/L pro Woche und m<sup>2</sup> (5% TOC-Abnahme in einer Woche im Mittel, bezogen auf 36 cm<sup>2</sup> Anodenfläche). Die aus der TOC-Abnahme und der auf die Anode übertragenen Elektronen berechnete Coulomb'sche Effizienz beträgt 1,3% (Ansatz 2) und 1,6% (Ansatz 1). Diese Ausbeute ist sehr gering, wenn lediglich 1,3 bzw. 1,6% der aus der Oxidation von Substraten entstandenen Elektronen auf die Anode übergehen und in Form des produzierten Stroms gemessen werden können. Zudem wird deutlich, dass es immer wieder zu starken Abfällen des pH-Wertes im System kommt (Abb. 28 A). Dies ist darauf zurückzuführen, dass es sich bei dem Abwasser um ein ungepuffertes System handelt (Rozendal *et al.*, 2008), welches es schwierig macht, den pH-Wert bei ca. 7 konstant zu halten. Auch dieser pH-Abfall, dem durch händische Titration nicht ausreichend entgegengewirkt werden kann, mag einen Einfluss auf die Leistung der Mikroorganismen in der Brennstoffzelle haben. In Ansatz 3, indem der Laborstamm *G. sulfurreducens* als Reinkultur mit dem hA-Abwasser in der M3C getestet wurde, kann die Annahme, dass der Stamm auf das der Isolate produzierte CO<sub>2</sub> in Ansatz 2 angewiesen ist, bestätigt werden. Wird das System lediglich mit N<sub>2</sub> begast, kann weder Stromproduktion, noch ein Abbau von Acetat oder des TOCs beobachtet werden (—, Abb. 29 und 31 A). Auch der pH-Wert bleibt über die gemessene Zeit von 7 Tagen konstant. Die Zellen bilden in diesem Zustand bräunlich-rote Aggregate, welche sich an den Bauteilen und am Boden des Reaktors absetzen. Der Stamm ist hier nicht fähig seinen Metabolismus aufrecht zu erhalten. Auch in der Literatur wurde bereits beschrieben, dass *Geobacter*-Zellen in Stresssituationen offensichtlich zur Aggregat-Bildung neigen (Esteve-Núñez *et al.*, 2005). Begast man das System jedoch mit N<sub>2</sub> / CO<sub>2</sub>, wird schnell deutlich, dass der Organismus unter diesen Bedingungen in der Lage ist, Acetat zu oxidieren und die Elektronen auf die Anode zu übertragen (—, Abb. 29). Zudem wurde hier die Temperatur von 37°C auf 30°C herabgesetzt, da dies der Kultivierungstemperatur von *G. sulfurreducens* entspricht. Zu Beginn des Experiments zeigt sich der gleiche Effekt, wie in Ansatz 2: nach etwa 2,5 Tagen beginnt der Strom zu sinken. Allerdings ist gegen Ende der ersten Woche wieder ein Anstieg der Stromdichte zu detektieren, was dafürspricht, dass das CO<sub>2</sub> für den Organismus zwar essentiell ist und wahrscheinlich auch für den Stromabfall in Ansatz 2 gesorgt hatte, jedoch aber nicht der einzige Faktor ist, der sich negativ auf die Leistung der Organismen, vor allem *G. sulfurreducens*, in dem System auswirkt. Gegen Ende der Woche steigt die Stromdichte wieder an. Dieser Effekt ist ebenfalls in den beiden anderen

Wochen zu sehen. Es scheint, als würde sich der Organismus erst nach einer gewissen Zeit an das Abwasser und eventuelle Störstoffe adaptieren. In Woche 2 und 3 kann jedoch die in der ersten Woche erzielte Stromdichte wieder nicht erreicht werden. Vermutlich werden hier mit dem Austausch des Abwassers wieder zu viel Zellen von der Anode gelöst und mit aus dem System entfernt. Im Vergleich zu der erzielten Stromdichte von Ansatz 1 und 2 konnte die Ausbeute mit diesem Experiment erneut verbessert werden mit einer mittleren Stromdichte von  $27,78 \text{ mA/m}^2$ . Dies kann in der Änderung der Begasung oder aber auch durch die Senkung der Temperatur zu erklären sein. Was im Vergleich zu der Begasung mit lediglich  $\text{N}_2$  auch deutlich zu erkennen ist, ist dass der Organismus nicht diese Aggregate bildet, sondern vermutlich in Interaktion mit der Anode tritt, da kaum Zellen in der planktonischen Phase des Anodenkompartiments zu finden sind, wie nicht vorhandene Trübung des Abwassers in Abb. 30 B zeigt. *G. sulfurreducens* ist bekannt dafür, dass er für die Übertragung von Elektronen auf extrazelluläre Elektronenakzeptoren mit diesen direkten Kontakt eingehen kann (Gude, 2016). Innerhalb dieser 3 Wochen kann man eine durchschnittliche Acetatabnahme von 9% (bezogen auf  $36 \text{ cm}^2$  Anodenfläche) und damit hochgerechnet  $1,05 \text{ M}$  pro Woche und  $\text{m}^2$  erzielen (—, Abb. 31 B). Es werden  $0,123 \text{ g/L}$  pro Woche (6%, bezogen auf  $36 \text{ cm}^2$ ) TOC abgebaut, was  $34,26 \text{ g/L}$  pro Woche und  $\text{m}^2$  entspricht (—, Abb. 31 B). Der Abgebaute TOC entspricht in etwa der Menge an verstoffwechseltem Acetat. Die kleinen Unterschiede lassen sich auf Messungenauigkeiten zurückführen. Die errechnete Coulomb'sche Effizienz beträgt 4,84%, was um das 3- , bzw. 3,7- fache mehr ist als in Ansatz 1 und 2. Was hier jedoch deutlich wird, ist dass der pH-Wert konstant zwischen 6,1 und 6,6 pendelt (—, Abb. 31 B) und hier schwer auf einen Wert über 7,0 zu bringen ist. Dies könnte der Begasung des Systems mit  $\text{CO}_2$  geschuldet sein, da eine Pufferwirkung einsetzt. Das System ist mit der Begasung Carbonat-gepuffert.

Vergleicht man nun den mittleren Verbrauch an TOC [ $\text{g/L}$  pro  $\text{m}^2$  und Woche] (■) und die mittlere Stromdichte [ $\text{mA/m}^2$ ] (■) (Abb. 32) miteinander, können drei Erkenntnisse den Batch-Experimenten entnommen werden: Zum einen verdoppelt sich, wie bereits erwähnt, durch die Zugabe des Laborstammes *G. sulfurreducens* zu den Isolaten nicht nur die Stromstärke, sondern auch der TOC-Verbrauch. Zum anderen konnte vermutlich durch die Änderung der Begasung von  $\text{N}_2$  auf  $\text{N}_2/\text{CO}_2$  die Leistung in dem Ansatz mit dem Laborstamm nochmals verbessert werden. Und der letzte Punkt ist, dass der TOC-Verbrauch in Ansatz 1 (Isolate) und der TOC-Verbrauch in Ansatz 3 (*G. sulfurreducens*) in Summe in etwa dem TOC-Verbrauch in Ansatz 2 (Isolate und *G. sulfurreducens*) entsprechen. Dies lässt darauf schließen, dass die Isolate und der Laborstamm unterschiedliche Substrate in dem System metabolisieren und damit eine Gemeinschaft zur Aufreinigung des Abwassers bilden. Dieser letzte Punkt ist unter der Annahme zu betrachten, dass

die CO<sub>2</sub>-Begasung in Ansatz 3 die Isolate ersetzt, welche durch Fermentation *G. sulfurreducens* in Ansatz 2 mit dem notwendigen Gas versorgen.

Anhand der Aufnahmen der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung der Anoden aus den unterschiedlichen Ansätzen, ist deutlich zu sehen, dass die isolierten Stämme des Solvay-Abwassers nur bedingt direkten Kontakt zu der Anode suchen. In Abbildung 33 A sieht man, wie sich im Zwischenraum der Anodenfasern ein Biofilm gebildet hat. Es scheint, dass der Biofilms zum Teil aus den Bakterien und zum anderen Teil aus viel schmalere Anodenfasern besteht. Es stellt sich an dieser Stelle die Frage, ob die Isolate das Anodenmaterial (Graphit-Vlies) abbauen. Wenn die Zellen in direktem Kontakt zu der Anode stehen, dann bilden sie keinen Biofilm aus, sondern sind als Einzelzellen auf den Anodenfasern zu finden (Abb. 33 B). Der Größe und Form der Zellen auf den Anoden entsprechend, könnte es sich hierbei um *E. coli* handeln. In Abbildung 33 C und D des Ansatzes 2 ist die Bildung eines Biofilms deutlich zu erkennen. Die körnige Struktur, bestehend aus kleinen, grün fluoreszierenden Zellen, zeigt, dass dieser hauptsächlich aus *G. sulfurreducens*-Zellen besteht und dieser sich um die Faser der Anode herum gebildet hat. Wie bereits erwähnt, muss der Organismus direkten Kontakt mit der Anode eingehen. Inmitten des Biofilms sind auch etwas größere, rot gefärbte Zellen zu erkennen (Abb. 33 D). Hierbei könnte es sich ebenfalls um *E. coli* handeln. Allerdings findet man keines der 3 anderen Isolate (*Clostridium* sp. I, *Clostridium* sp. II oder *Paenibacillus* sp.) als Bestandteil des Biofilms oder auf den Anodenfasern. Ähnlich, wie in den Fluoreszenz-Bildern von Ansatz 1, scheint es, aufgrund der Form und Größe, dass lediglich *E. coli* in der Lage ist, den direkten Kontakt mit den Fasern der Anode einzugehen, wobei dieser Kontakt vermutlich nicht der Übertragung von Elektronen dient. In einer Arbeit von Leung *et al.* (1998) konnte gezeigt werden, dass Gram-negative *E. coli*-Zellen besser an eine Oberfläche adhären können, als Gram-positive Zellen der Gattung *Enterococcus*. Neben der Tatsache, dass *G. sulfurreducens* den direkten Kontakt mit der Anode eingeht und damit vermutlich auch die anderen Zellen verdrängt, könnte die Adhäsionseigenschaft auch eine Rolle für die Lokalisation der unterschiedlichen Organismen haben. Vergleicht man Ansatz 3 mit der zuvor in Ansatz 2 beobachteten Biofilmbildung, ist zu erkennen, dass *G. sulfurreducens* alleine kein Biofilm auf der Anode ausbildet (Abb. 33 E und F). Lediglich kleine Formationen von mehreren Zellen sind zu beobachten. Für die Bildung eines Biofilms spielen mehrere Faktoren eine Rolle. So konnte gezeigt werden, dass der pH-Wert ebenfalls Einfluss auf die Biofilm-Bildung hat. Weicht dieser zu stark von den neutralen Bedingungen ab, sowohl ins Alkalische, als auch ins Saure, hat das Auswirkungen auf die Bildung eines Biofilms. So konnte beobachtet werden, dass ein bestehender Biofilm von *G. sulfurreducens*, der über längere Zeit einem pH-Wert von 5,0 ausgesetzt wird, sich von der Oberfläche löst (Patil *et al.*, 2011). Somit könnte der etwas niedrige pH-Wert von ca. 6,0 auch hier der Grund dafür

sein, dass *G. sulfurreducens* unter diesen Bedingungen keinen derartigen Biofilm, wie in Ansatz 2 ausbildet. Zudem könnten auch, wie bereits erwähnt, Störstoffe in dem Abwasser vorhanden sein, welche sich nicht nur auf die Leistung, sondern demnach auch auf die Ausbildung des Biofilms von *G. sulfurreducens* auswirken. Zudem ist bekannt, dass die Gemeinschaft in solchen synergistischen Interaktionen (Biofilme von gemischten Kulturen) in einer Weise zusammenarbeitet, dass sie sich durchaus gegenseitig vor antimikrobiellen Substanzen schützen können. Dabei spielt die Zusammensetzung der extrapolymere Substanzen (EPS) eine entscheidende Rolle (Elias & Banin, 2012). Somit fördert genau diese synergistische Interaktion die Biofilmbildung, wie sie im FISH von Ansatz 2 zu sehen ist. Somit ist nicht nur die Versorgung mit Produkten des Metabolismus (Acetat und CO<sub>2</sub>) für *G. sulfurreducens* entscheidend, sondern eventuell auch der Schutz vor möglichen Stoffen, die den Organismus in seinem Wachstum hemmen.

Vergleicht man abschließend die Leistung, welche in den Batch-Experimenten erbracht wurde, kann gesagt werden, dass diese bezüglich der erreichten Stromdichten mit 7,56 mA/m<sup>2</sup> für die Isolate, 14,89 mA/m<sup>2</sup> für die Isolate und *G. sulfurreducens* und 27,78 mA/m<sup>2</sup> für *G. sulfurreducens* sehr gering sind. Auch der durchschnittliche TOC-Verbrauch von 5%, 12% und 6% (bezogen auf die tatsächliche Anodenfläche), ist sehr gering, da noch viel Rest-TOC im Abwasser verbleibt. Auch die erzielten CEs sind mit 1,6%, 1,3% und 4,84% sehr niedrig. Bisher konnten mit mikrobiellen Brennstoffzellen und Abwasser als Substrat deutlich bessere Ergebnisse erzielt werden. Ebenfalls in einem Batch-Experiment wurde Abwasser aus einer Papierfabrik getestet. Es wurde eine Stromstärke von 125 mA/m<sup>2</sup> erreicht. 78% des CSBs konnte mit dieser Methode entfernt werden und eine CE von 26% wurde erreicht (Velasquez-Orta *et al.*, 2011). Mit Abwasser aus einer Alkoholbrennerei konnte beispielsweise eine Stromdichte von 1 bis 2 A/m<sup>2</sup> Anodenfläche, ein CSB-Abbau von 46 % - 76% und eine CE von bis zu 89% erreicht werden. Diese Experimente wurden jedoch mit einem Durchfluss-System erzielt (Ha *et al.*, 2012).

#### 5.4. M3C mit hA-Abwasser im Durchfluss

Aufgrund der geringen Leistung des Batch-Systems mit dem Abwasser der Firma Solvay, wurde in weiteren Versuchen getestet, ob mit der Umstellung auf ein Durchfluss-System, wie von Ha *et al.*, 2012 beschrieben, eine Verbesserung der Leistung bezüglich Stromproduktion und Abwasseraufbereitung (TOC-Abbau) erreicht werden kann. Dafür wurden lediglich Ansatz 1 mit den Isolaten (—, Abb. 34) und Ansatz 2 mit den Isolaten und *G. sulfurreducens* (—, Abb. 34) getestet und miteinander verglichen. Hier wurde, durch die im Batch-System von *G.*

*sulfurreducens* erzielte höhere Stromdichte, direkt mit  $N_2/CO_2$  begast und die Temperatur wurde auf  $30^\circ C$  herabgesetzt. Da durch die vorherigen Versuche die Annahme bestand, dass die Organismen, vor allem der Laborstamm, Probleme mit eventuellen Störstoffen im Abwasser haben und möglicherweise erst nach einer Zeit an das Abwasser adaptieren, wurde für die ersten 9 Tage zunächst über ein Batch-System mit synthetischem Abwasser eine Adaptation der Organismen an die M3C gewährleistet. Nach dieser Zeit wurde das hA-Abwasser mit einer geringen Flussrate von  $0,015 \mu l/min$  und einer HRT von 12,5 Tagen durch den Reaktor gepumpt, um auch hier eine stetige Adaptation der Organismen an das Abwasser zu erhalten. Durch dieses Prinzip konnte erreicht werden, dass die mittlere Stromdichte für den Zeitraum von 84 Tagen im Vergleich zu den Batch-Experimenten um das 87-fache mit  $656,97 mA/m^2$  für Ansatz 1 und um das 91-fache für Ansatz 2 mit  $1368,25 mA/m^2$  gesteigert werden konnte. Dies ist eine enorme Leistungssteigerung des Systems. Zudem ist, wie in den Batch-Experimenten zu beobachten, dass durch Zugabe des Laborstammes *G. sulfurreducens* die Stromdichte verdoppelt werden konnte. Was auch sehr deutlich wird, ist das der TOC sowohl in Ansatz 1, als auch in Ansatz 2 über die Zeit deutlich abnimmt (— und —, Abb. 36 A). Bis Tag 57 kann beobachtet werden, dass 29,93% des TOC in Ansatz 1 abgebaut werden, wohingegen in Ansatz 2 bis zu Tag 59 72,9% abgebaut werden. Mit dem drastischen Abfall des TOC in Ansatz 1 bis Tag 59, scheint es, als würden zu diesem Zeitpunkt bereits die Betriebsprobleme durch die Verstopfung der Schläuche einsetzen. Basierend auf den Ergebnissen der gemessenen Stickstoffverbindungen (Ammonium, Nitrat und Nitrit) im Abwasser, konnte berechnet werden, dass ca.  $0,52 g/L$  TOC für die Eliminierung des Stickstoffs übrig bleiben müssten. Mit dem Wert  $0,55 g/L$  an Tag 59 (vor Start der Betriebsprobleme), wäre die Abwasseraufbereitung durch die Organismen optimal, um den Rest des TOC für die Eliminierung der Stickstoffverbindungen zu nutzen. Das Verhältnis des TOC-Abbaus von Ansatz 1 zu 2 ist hier gleich dem, was auch in den Batch-Versuchen gezeigt werden konnte. Die Isolate alleine sind nicht in der Lage so viel Substrat im Abwasser abzubauen, wie in Ko-Kultur mit *G. sulfurreducens*. Dies wird auch deutlich, wenn man sich die Acetatkonzentration während dieser Zeit betrachtet (— und —, Abb. 36 B). Während die Acetatkonzentration in Ansatz 1 bis zu Tag 57 kontinuierlich ansteigt, bzw. ab einem Punkt relativ konstant bleibt, wird in Ansatz 2 durch *G. sulfurreducens*  $11,52 mM$  Acetat abgebaut, das entspricht 75,19%. Wie bereits beschrieben, betreiben die Isolate Gärung, wobei Acetat entsteht. Daher ist eine Zunahme der organischen Säure in Ansatz 1 zu erklären. Für die Isolate konnte hier eine CE von 23,79% erreicht werden und für den Ansatz mit den Isolat und *G. sulfurreducens* 54,98%. Die ist eine deutliche Steigerung im Vergleich zu den Batch-Experimenten, was zeigt, dass in diesem Fall der Umstieg auf das Durchfluss-System die optimalen Bedingungen für die Aufbereitung des Abwassers bietet.

In diesem Versuch wurde zusätzlich der Einfluss der Flussrate auf die Leistung des Systems getestet. Was hier deutlich zu sehen ist, ist dass mit der Erhöhung der Flussrate, ebenso eine Erhöhung der Stromdichte erzielt werden kann und auch umgekehrt, mit Herabsetzen der Flussrate eine Abnahme der Stromdichte zu verzeichnen ist (Abb. 35 A). Betrachtet man jedoch nun den TOC-Abbau, speziell in Ansatz 2 (—, Abb. 36 A), so wird deutlich, dass mit der steigenden Flussrate, der TOC-Abbau nicht mehr derart kontinuierlich verläuft, wie zu den Zeitpunkten mit der langsameren Flussrate 0,015 ml/min oder auch 0,1875 ml/min. Der TOC-Abbau nimmt demnach ab und fluktuierende Werte während der Zeit der hohen Flussraten 0,0234 ml/min und 0,0293 ml/min können detektiert werden. Dieses Phänomen ist nicht unbekannt und wird auch in der Literatur häufiger beobachtet: eine steigende Flussrate und damit niedrige HRT führt zu einer Steigerung der Stromproduktion (Aaron *et al.*, 2010; Di Lorenzo *et al.*, 2010). Allerdings kann bei zu hohen Flussraten die Stromausbeute wieder deutlich sinken (Ieropoulos *et al.*, 2010). Mit steigender Flussrate sinkt hingegen der CSB-, bzw. TOC-Abbau, da durch solch geringe HRTs die Verweilzeit der Substrate im Anodenkompartiment zu gering ist, sodass sie von den Organismen nicht in großen Mengen verstoffwechselt werden können (Di Lorenzo *et al.*, 2010; Juang *et al.*, 2011). Zudem haben Scherkräfte auch einen enormen Einfluss auf die Leistung von Organismen in einer Brennstoffzelle. Mit höheren Scherkräften im Anodenkompartiment kann der Biofilm der Anode teilweise abgetragen werden, wodurch die Stromproduktion ebenfalls sinken kann (Pham *et al.*, 2008; Herbert-Guillou *et al.*, 2001). Solche Scherkräfte können durchaus durch die hohen Flussraten zustande gekommen sein und eventuell zusätzlichen negativen Einfluss auf die Leistung der M3C gehabt haben.

Was in diesem System auch deutlich verbessert werden konnte, war die Stabilisierung des pH-Wertes. Aufgrund der kontinuierlichen Zufuhr mit hA-Abwasser, was einen pH-Wert zwischen 7,5 und 8,1 besitzt, musste der pH-Wert lediglich alle 2 Tage neu auf ca. 7,2 titriert werden. Um das Problem mit dem ständig sinkenden pH-Wert zu beheben, wurde nach den 84 Tagen Laufzeit lediglich Ansatz 2 mit den Isolat und *G. sulfurreducens* weiter verfolgt. Zunächst wurde, aufgrund der zugesetzten Membran, das komplette Kathodenkompartiment einmal ausgetauscht. Dies geschah unter aeroben Bedingungen. Daher wurde das System nach dem Austausch wieder an den Potentiostat angeschlossen und sollte sich für 10 Tage regenerieren. Nach dieser Zeit wurde eine automatische pH-Kontrolle angeschlossen. Was daraufhin zu sehen ist, ist dass die Stromdichte kontinuierlich ansteigt, bis an Tag 45 das Experiment beendet wurde. Direkt nach dem Anschluss der pH-Kontrolle ist die Stromdichte, vermutlich wegen Eintrag von Sauerstoff in das System wieder gefallen. Bis Tag 20 steigt diese jedoch an und es lässt sich eine mittlere Stromdichte von 1325,17 mA/m<sup>2</sup> und eine CE = 31,08% berechnen. Ab Tag 20 ist das System nach dem Anschluss wieder regeneriert und

bis 32 steigt die mittlere Stromdichte in diesem Zeitraum auf 1437,67 mA/m<sup>2</sup> und es lässt sich eine CE von 30,29% errechnen. Ab Tag 32 bis 45 lässt sich eine erneute Steigerung der mittleren Stromdichte von verzeichneten 1567,29 mA/m<sup>2</sup> und auch eine Erhöhung der CE auf 43,36%. Die Zugabe mit 1 M NaOH in das System ist immer direkt in der aufgezeichneten Stromdichte zu sehen. Unmittelbar nach der Titration steigt die Stromdichte an (↓ 2, Abb. 38). Dies ist in allen Versuchen zu beobachten, sobald man die Base dem System zuführt (Abb. 26 und 29 Peaks bei ca. 2,5 Tagen, ↓ 4, Abb. 35 A). Mit kontinuierlicher pH-Kontrolle und Titration von 1 M NaOH wird deutlich, dass das System eine Leistungssteigerung erfährt. Wie bereits erwähnt, könnte das einerseits daran liegen, dass der pH-Wert ständig im neutralen, physiologischen Bereich gehalten wird, was für die Organismen optimal ist, da Schwankungen Einfluss auf deren Aktivität haben kann und somit auch auf die Stromproduktion (Jadhav & Ghangrekar, 2009; Behera & Ghangrekar, 2009). Es wird vermutet, dass eine geringe Pufferkapazität im Abwasser dafür sorgt, dass der elektrochemisch aktive Biofilm durch die Transportrate der Protonen aus dem Biofilm selbst limitiert wird (Torres *et al.*, 2008). Zudem konnte auch gezeigt werden, dass eine höhere Leitfähigkeit die Stromproduktion erhöht (Velasquez-Orta *et al.*, 2011). Durch den Anschluss der pH-Kontrolle in Ansatz 2 wurde die Leitfähigkeit durch den Eintrag von NaOH und damit weiteren Ionen von 6,5 mS auf 9,6 mS erhöht. Dies könnte ein zusätzlicher Grund für die Steigerung der Stromdichte sein. Generell wird im Durchfluss-System immer neues Abwasser dem Anodenkompartiment zugeführt, welches eine hohe Leitfähigkeit (6,5 mS) besitzt. Dieser Effekt hat durchaus auch Einfluss auf die verbesserte Stromproduktion im Durchfluss-Experiment im Vergleich zu den Batch-Experimenten. Sowohl der TOC als auch die Acetatkonzentration bleiben während dieser Messphase weitestgehend konstant. Der TOC schwankt leicht zwischen 0,54 g/L und 0,69 g/L und die Acetatkonzentration zwischen 3,5 mM und 6,95. Was jedoch beide Kurven gemein haben, ist der Anstieg in den letzten 5 Tagen. Nicht nur die Acetatkonzentration und der TOC steigen in diesen Tagen an, sondern auch die Stromdichte verändert sich: es ist ein Abfall der Stromproduktion zu sehen. Aus diesem Grund wurde die M3C nach den weiteren 45 Tagen mit pH-Kontrolle abgeschaltet. Nichtsdestotrotz konnte durch den Wechsel von dem Batch-Verfahren auf das Durchfluss-Verfahren eine enorme Leistungssteigerung erzielt werden, was die Aufbereitung des Abwassers mit diesem System realisierbar macht. Auch die dabei produzierte Strommenge ist recht hoch. Wie zuvor erwähnt, konnten bereits derartige Stromausbeuten erzielt werden: Abwasser aus einer Alkoholbrennerei erzielte eine Stromdichte von 1 – 2 A/m<sup>2</sup> Anodenfläche und ein CSB-Abbau von 46% - 76% (Ha *et al.*, 2012). Mansoorian *et al.* (2016) erzielte bei der Untersuchung von Molkereiabwasser eine max. Stromdichte von 795,74 mA/m<sup>2</sup> und einen CSB-Abbau von 78,21% bis 90,46%. Beide Versuche wurden im Durchfluss-Verfahren durchgeführt. Für die Anwendung in dem Klärwerk direkt, ist diese Art von Reaktor jedoch nicht geeignet. Zum einen ist das Volumen mit 280 ml zu gering. Hierfür würden sich

stapelbare Module eignen, bei denen jedes einzelne Modul eine eigenständige Brennstoffzelle darstellt. Dong *et al.* (2015) konnten mit ihrem Stapel-MFC-Aufbau im 90 L-Maßstab ohne zusätzlichen Energieeintrag mit einem CSB-Abbau von 87,6% und einer max. erreichten Stromdichte von 0,059 A/m<sup>2</sup>, erfolgreich Brauereiabwasser aufreinigen. Auch die Anodenfläche in dem in dieser Arbeit verwendeten Reaktor, ist mit 36 cm<sup>2</sup> im Vergleich zu dem Volumen (280 ml) sehr gering. Bei einer solchen Reaktor-Vergrößerung sollte die Größe der Arbeitselektrode im Verhältnis zu dem Reaktorvolumen erhöht werden, um eine effizientere Leistung zu erzielen (siehe 5.5).

Wie auch für die Batch-Experimente, wurde die Anode von Ansatz 2 mit den Isolaten und *G. sulfurreducens* für die Visualisierung der Organismen und des Biofilms auf den Anodenfasern über FISH mit Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt. Hier ist zu sehen, dass sich ebenfalls Biofilme ausbilden, welche aber viel größer sind als die des gleichen Batch-Experiments (Ansatz 2). Die Biofilme auf der Anode des Durchfluss-Experiments bewachsen nicht nur die einzelnen Anodenfasern, sondern auch die Zwischenräume zwischen den Fasern (Abb. 40 A bis D). Die Biofilme bestehen wieder hauptsächlich aus *G. sulfurreducens*-Zellen und nur wenige *E. coli*-Zellen sind sichtbar. Da hier direkt *E. coli* angefärbt wurde, kann auch mit Sicherheit bestätigt werden, dass es sich hierbei um den Organismus handelt. Vergleicht man diese Bilder mit den rot gefärbten Zellen des Biofilms im Batch-Experiment des 2. Ansatzes, lassen sich auch hierauf die Rückschlüsse ziehen, wie bereits angenommen, dass es sich um *E. coli* handelt, welcher mit *G. sulfurreducens* ebenfalls den Biofilm auf der Anode (Abb. 33 C und D) ausbildet. Wenn auch, in beiden Fällen, nur in sehr geringer Zellzahl. Zudem ist wieder zu beobachten, dass *Clostridium* sp. I, *Clostridium* sp. II und *Paenibacillus* sp. nicht Teil des Biofilms sind, sondern ausschließlich in der planktonischen Phase der Brennstoffzelle zu finden sind, ebenso wie der Großteil der *E. coli*-Zellen (Abb. 40 E und F).

## 5.5. Ermittlung der finalen Zusammensetzung der Organismen auf der Anode

Die Zellzahl von *G. sulfurreducens* im Batch- und Durchfluss-Experiment wurde zudem über die Quantifizierung mittels qPCR bestimmt. Hier konnte gezeigt werden, dass mit der Umstellung auf den Durchfluss die Zellzahl um das 5000-fache gesteigert werden konnte. Nun könnte das jedoch auch an der unterschiedlichen Inkubationsdauer von 21 im Vergleich zu 129 Tagen liegen, jedoch ist in dem Batch-Experiment bereits Ende der dritten Woche zu sehen, dass kaum noch Strom produziert wird und auch der TOC-Verbrauch ist nicht

mehr so hoch, wie in der ersten Woche. So kann angenommen werden, dass mit längerer Laufzeit des Batch-Experimentes eine derart hohe Zellzahl des Laborstammes nicht zu erreichen wäre. Wenn man nun aber bedenkt, dass die Zellzahl um das 5000-fache ansteigt, die mittlere Stromdichte jedoch nur um das 91-fache, muss hier davon ausgegangen werden, dass die Größe der Anodenfläche ein limitierender Faktor ist und nicht alle Zellen des Biofilms Elektronen auf die Anode übertragen können. Distanzen zum Elektronenakzeptor können von *G. sulfurreducens* mit Hilfe sog. Nanowire überwunden werden. So kann der Elektronentransport über längere Wege sichergestellt werden (Reguera *et al.*, 2005). Jedoch werden in einem solch großen Biofilm lediglich die äußeren Zellen mit Substrat versorgt und nicht die untersten Schichten. Somit gibt es hier aktive und inaktive Zellen, die den Biofilm ausbilden. Der ausgebildete Biofilm von *G. sulfurreducens* auf Anoden kann eine Dicke von 50  $\mu\text{m}$  erreichen (Reguera *et al.*, 2006; Nevin *et al.*, 2008; Marsili *et al.*, 2010), an manchen Stellen der Anode wurde sogar bereits eine Dicke von bis zu 90  $\mu\text{m}$  gemessen (Nevin *et al.*, 2009). Diese enorme Dicke macht Nanowire essentiell für die Übertragung der Elektronen. Es wurde des Öfteren gezeigt, dass mit einer Vergrößerung der Anodenfläche die Stromausbeute erhöht werden kann (Chaudhuri & Lovley, 2003; Di Lorenzo *et al.*, 2010). Bei größeren, dichteren Biofilmen, würden innen lokalisierte Zellen nicht mehr mit Substrat versorgt werden, wie es auch bei dem Biofilm des Durchfluss-Experimentes anzunehmen ist. Normalerweise können sich in so einem Falle, Bakterien von dem Biofilm lösen und neue Oberflächen besiedeln (Allison *et al.*, 1998; Watnick & Kolter, 2000). Jedoch ist dies in der M3C nicht möglich, da keine weitere freie Oberfläche zu Verfügung steht. So wäre eine Vergrößerung der Anodenfläche eine mögliche Option die Leistung des Systems weiter zu steigern. Über die qPCR und eine Metataxonomanalyse konnte zudem die finale Zusammensetzung der Mikroorganismen von Ansatz 2 im Batch- und Durchfluss-System bestimmt werden. Beide Analysen zeigen, dass *G. sulfurreducens* mit unter 1% in einer verschwindend geringen Anzahl auf der Anode des Batch-Experiments vorkommt. Dies ist sehr verwunderlich, da der Organismus über die Fluoreszenzfärbung deutlich erkennbar ist und zudem kleine Biofilme ausgebildet hat, welche um die einzelnen Anodenfasern gewachsen sind. Eine mögliche Erklärung könnte hier eventuell sein, dass bei der DNA-Isolierung diese Biofilme schlecht von den Fasern der Anode abzulösen waren, weil sie in engem Kontakt zu diesen standen und damit sehr stabil an der Anode angelagert waren. Die Hauptvertreter aus den Anoden der Batch-Experimente, welche über die Metataxonomanalyse identifiziert werden konnten, sind *E. coli* und *Paenibacillus* sp. mit 58,1% und 41,5%. Beide Organismen sind in dieser Anzahl nicht auf den Anoden über FISH nachzuweisen. Lediglich einzelne Zellen, vermutlich *E. coli*, können im von *Geobacter* gebildeten Biofilm nachgewiesen werden. Der Grund hierfür könnte aber jedoch bei der FISH-Methode selbst liegen, da die Anode während der Färbung immer wieder mit Flüssigkeit überschichtet und gewaschen wird und dabei womöglich die Zellen, welche nicht

in direktem Kontakt zur Anode stehen oder kein Biofilm ausbilden, aus dem Fasernetzwerk ausgewaschen werden. Die beiden *Clostridium*-Arten konnten hier nicht nachgewiesen werden. Im Durchflussexperiment zeigt sich, dass *G. sulfurreducens* mit 82,7%, bzw. 73% (ermittelt über Metataxonomanalyse und qPCR) die Mehrheit der Zusammensetzung auf der Anode bildet. Dies bestätigen auch die Bilder der FISH-Färbung. Wobei hier auch 2,6% *E. coli*, 1,3% *Paenibacillus* sp. und 1,3% den beiden *Clostridium*-Arten zugeordnet werden kann. *E. coli* ist auch auf den Bildern der FISH-Färbung deutlich in geringer Anzahl zu erkennen, jedoch konnte keiner der anderen Organismen auf den Bildern nachgewiesen werden. Neben den, in den Experimenten eingesetzten Organismen, konnten auch andere Organismen in der Metataxonomanalyse identifiziert werden, welche Teil der finalen Zusammensetzung auf der Anode sein sollen. In dem Batch-Experiment wurden 0,3% als unbekannte Prokaryoten identifiziert, was in der geringen Zahl zu vernachlässigen ist. Jedoch wurden im Durchfluss-Experiment mit 12,1% Familien, wie *Burkholderiaceae*, *Pseudomonaceae* und *Rhodocyclaceae* identifiziert. Hierbei handelt es sich möglicherweise um eine Kontamination der DNA-Proben, die für die Sequenzierung verwendet wurden. Eine Kontamination im Durchfluss-Experiment kann ausgeschlossen werden, da man in der Fluoreszenz-gefärbten Anode keine Zellen sehen kann, welche lediglich über DAPI angefärbt sind und sich in ihrer Form von dem Rest unterscheiden. Alle verwendeten Sonden binden ausschließlich an die Isolate und *G. sulfurreducens*, sollten aber nicht an Organismen dieser drei Familien binden.

## 5.6. Wachstumsversuche mit *G. sulfurreducens*

Neben den Experimenten in der M3C wurden ebenfalls Versuche durchgeführt, welche eventuelle Störstoffe, wie Phosphat und Ammonium, im Abwasser ermitteln sollten. Da in den Batch-Experimenten festgestellt werden konnte, dass *G. sulfurreducens* eine schlechte Leistung zeigt und dies möglicherweise mit genau solchen Stoffen zusammenhängt. Die in Abbildung 25 dargestellten Wachstumskurven mit *G. sulfurreducens* zeigen jedoch, dass weder Ammonium, noch Phosphat in erhöhten Konzentrationen einen negativen Einfluss auf das Wachstumsverhalten des Stammes haben. Das Wachstum mit erhöhter Phosphatkonzentration ist mit einer Verdopplungszeit von 18,1 h dem Wachstum in *Geobacter*-Medium ähnlich ( $t_d = 17,7$  h). Erhöht man jedoch die Ammoniumkonzentration auf 17,62 mM, was der Konzentration im Abwasser entspricht, wird das Wachstum des Organismus gesteigert. Hier kann eine Verdopplungszeit von 11,8 h detektiert werden. Erhöht man sowohl die Phosphat-, als auch die Ammoniumkonzentration, zeigt sich ein ähnliches Wachstum, wie bei Erhöhung der Ammoniumkonzentration alleine ( $t_d = 11,8$  h). Somit sind Phosphat und Ammonium in den im Abwasser enthaltenen Konzentrationen nicht

wachstumslimitierend für *G. sulfurreducens*. Eventuell gibt es andere Stoffe in dem Abwasser, die als Störstoff auf den Organismus wirken. Jedoch konnte im Zuge dieser Arbeit kein Störstoff identifiziert werden. Im Anschluss daran wurden Wachstumsversuche von *G. sulfurreducens* mit verschiedenen hA-Konzentrationen durchgeführt, welche zeigten, dass in 75% hA noch minimales Wachstum zu verzeichnen war. Ausgehend von diesem Versuch wurde mit der Konzentration ein Adaptationsexperiment gestartet, welches zeigen sollte, dass der Stamm in der Lage ist, sich über einen längeren Zeitraum an das Abwasser anzupassen und sein Wachstum zu steigern. Jedoch zeigten die Wachstumsversuche nicht das erwartete Adaptationsbild. Der Organismus zeigt in der ersten Woche das beste Wachstum, welches auch in der 6. AG nicht gesteigert werden kann. Trotz allem kann eine Verbesserung der Wachstumsrate und Verdopplungszeit von der 2. Bis 6. AG aufgezeigt werden.

## 5.7. Transkriptomanalyse

Mit der Transkriptomanalyse sollten die zellulären Mechanismen von Ansatz 2 des Batch- und Durchfluss-Experiments und auch der 1. und 6. AG des Adaptations-Experiments in 75% hA identifiziert werden. Bei der genaueren Betrachtung der Adaptation auf Proteinebene, wird deutlich, dass sich *G. sulfurreducens* an das Abwasser adaptiert hat. Aufgrund der höheren Expressionslevel einiger Gene, welche für Enzyme des Citratzyklus, der Acetat-Oxidation oder auch der Elektronentransportkette codieren, kann aufgezeigt werden, dass der Organismus seine Stoffwechselrate als eine Art der Adaptation gesteigert hat. Die Adaptation ist somit nicht im Wachstum sichtbar, aber auf zellulärer Ebene. Möglicherweise wird die produzierte Energie, in Form von ATP, in die Anpassungsprozesse an das Abwasser gesteckt. In einer Arbeit von Izallalen *et al.* (2008) ist genau dieses Phänomen beschrieben: Wird die Respirationsrate in *G. sulfurreducens* erhöht, verringert sich die Wachstumsrate. Auch hier zeigen sich bei einer Transkriptomanalyse höhere Expressionslevel von Genen für den Energiestoffwechsel (Citratzyklus und NADH-Dehydrogenasen). Zudem konnte gezeigt werden, dass das Gen *ack* (Acetat-Kinase) schwächer exprimiert wird, wenn der Stoffwechsel und damit der ATP-Verbrauch gesteigert werden. Es wurde vermutet, dass dies ein möglicher Grund für die verminderte Wachstumsrate ist, da mit diesem Enzym die Acetat-Assimilation zur Biomasseproduktion über Glukoneogenese durch die Phosphorylierung von Acetat zu Acetyl-Phosphat beginnt. Auch in der 6. Adaptationsgeneration ist das Transkriptionslevel von *ackA* im Vergleich zur 1. Adaptationsgeneration leicht verringert, was womöglich auch hier ein Grund für die niedrigeren Wachstumsraten der 2. bis 6. AG im Vergleich zur 1. ist. In diesen Fällen könnte das Acetat über die Acetyl-CoA-Transferase, welche Acetat und Succinyl-CoA in Succinat und Acetyl-CoA umwandelt, in den Citratzyklus eingebracht werden (Mahadevan *et al.*, 2006). Zudem sind einige

Transporter und Efflux-Proteine, wie der ABC Transporter für organische Lösungsmittel *GSU0813* und die RND Efflux-Pumpen codierenden Gene *GSU2135* und *GSU2136*, stärker exprimiert. ABC Transporter und RND (resistance-nodulation-division) Efflux-Pumpen schützen die Organismen vor möglichen Toxinen oder Stoffen, welche schädlich sind für die Zelle. So können über die RND-Efflux-Pumpen, welche hauptsächlich in Gram-negativen Bakterien vorkommen, Antibiotika, Detergenzien oder aber freie Fettsäuren aus der Zelle transportiert werden (Nikaido, 1996). Auch die ABC Transporter sorgen für den Export von Toxinen und anderen antimikrobiellen Agenzien (Davidson & Chen, 2004). So kann es sein, dass auch in dem Wachstumsversuch die Transporter toxische Substanzen aus der Zelle transportieren. Da die genaue Zusammensetzung des Abwassers unbekannt ist, ist es durchaus möglich, dass organische Lösungsmittel oder andere Toxine in dem Abwasser vorhanden sind, welche einen möglichen Störstoff darstellen und dadurch sekretiert werden. Für einige Proteine (SodA, *GSU0191*, Usp-4, *GSU2970*), welche der zellulären Stressantwort zugeschrieben werden können (McInerney *et al.*, 2007; Holmes *et al.*, 2006), konnten niedrige Expressionslevel in der 6. AG nachgewiesen werden, möglicherweise ebenfalls eine Art der Adaptation an das Abwasser durch *G. sulfurreducens*. Eine weitere Adaptation an das Abwasser könnte die höhere Expression von *amtB* (codiert für einen Ammonium-Transporter; Import) darstellen, da das Abwasser eine hohe Konzentration von Ammonium (17,62 mM) enthält. All diese verstärkte Produktion von Transport-Proteine und Enzyme des Stoffwechsels kostet den Organismus Energie in Form von ATP. Wie zuvor beschrieben, kann kein stärkeres Wachstum als Ergebnis der Adaptation beobachtet werden, allerdings eine stärkere Expression vieler Proteine. Es scheint also, als würde die Energie dafür verwendet werden. Zudem ist auch eine stärkere Expression von Genen für die Flagellenbildung und die N<sub>2</sub>-Fixierung zu sehen, beiden Prozesse, die Energie benötigen (Simpson & Burris, 1984; Armitage, 1999).

In dem Durchfluss-Experiment der M3C konnte die Stoffwechselrate im Vergleich zu den Wachstumsversuchen in der Flasche abermals gesteigert werden, vor allem in Bezug auf die 1. AG. Gene des Energiestoffwechsels (Citratzyklus und NADH-Dehydrogenasen) sind auch hier deutlich höher exprimiert. Zusammen mit der höheren Expression der Transporter für potentielle Toxine (ABC und RND Efflux-Pumpen) zeigt sich hier eine noch stärkere Adaptation an das Abwasser. In der M3C zeigt sich jedoch noch ein anderes Bild: Aufgrund des unterschiedlichen Elektronenakzeptors (Anode anstatt Fumarat) zeigt sich eine deutlich höhere Expression einiger c-Typ-Cytochrome und zudem sind mehr Cytochrome exprimiert, als in dem Versuch mit Fumarat als Elektronenakzeptor. Dies ist darin begründet, dass diese essentiell sind für den extrazellulären Transport der Elektronen, wie zum Beispiel MacA, OmcE oder OmcZ (Mehta *et al.*, 2005; Nevin

*et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2015). Auch Gene für die Ausbildung der TypIV Pili sind vermehrt exprimiert, was der Überwindung von Distanzen für den Elektronentransport der Organismen zu der Elektrode dient (Reguera *et al.*, 2005). Da in dem Durchfluss-Experiment ein dichter Biofilm von *G. sulfurreducens* ausgebildet wurde, gewährleisten die Pili hier den Elektronentransport von Zellen, welche nicht in direktem Kontakt mit der Anode stehen. So ist die verstärkte Expression dieser Gene nicht verwunderlich. Einige Gene, welche für Proteine der zellulären Stressantwort codieren, sind in der M3C von *G. sulfurreducens* stärker exprimiert und nicht mehr runter reguliert, wie in der 6. AG. Ein Stressfaktor könnte hier die Substrat-Limitierung sein, da nicht alle Zellen des Biofilms ausreichend mit Substrat versorgt sind. Die Expression von Genen, welche für Hydrogenasen codieren, zeigen sich bei Anodenatmung ebenfalls hoch. *G. sulfurreducens* kann neben Acetat ebenfalls  $H_2$  oxidieren (Caccavo *et al.*, 1994), dieser Wasserstoff könnte in der M3C durch die Isolate als Beiprodukt der Gärung produziert werden (Madigan *et al.*, 2008). Die *Geobacter*-Zellen aus der M3C (DF) exprimieren auch deutlich mehr Gene für die Chemotaxis oder die Flagellenbildung. Beispielsweise ist die Ausbildung von Flagellen und die damit verbundene Beweglichkeit der Zelle in Organismen wie *E. coli* oder aber auch *P. aeruginosa* wichtig für die Ausbildung von Biofilmen (Pratt & Kolter, 1998; O'Toole & Kolter, 1998). Somit könnte dies auch für *G. sulfurreducens* wichtig sein, um den Biofilm auszubilden. Zudem wird angenommen, dass *Geobacter*-Species über die Beweglichkeit mittels Flagellen neue  $Fe^{3+}$ -Oxid-Quellen lokalisieren können (Ueki *et al.* 2012). In *G. metallireducens* konnte gezeigt werden, dass Flagellen lediglich in Anwesenheit von  $Fe^{3+}$ - oder  $Mn^{4+}$ -Oxiden ausgebildet werden, nicht aber, wenn  $Fe^{3+}$  löslich vorkommt. So geht man davon aus, dass die Fortsätze und die dadurch gewährleistete Bewegung der Zelle, dem Organismus helfen, den Elektronenakzeptor (Oxide) zu finden und mit ihm in Kontakt zu kommen (Childers *et al.*, 2002). Dies könnte auch für *G. sulfurreducens* in dieser Arbeit in Anwesenheit einer Anode zutreffen, es werden vermehrt Flagellen in Anwesenheit einer unlöslichen Anode im Vergleich zu Fumarat als Elektronenakzeptor ausgebildet.

Neben der Anpassung von *G. sulfurreducens* an das Durchfluss-System und das Abwasser, konnten ebenso einige mögliche Stoffwechselwege der Isolate *Clostridium* sp. I und II, *E. coli* und *Paenibacillus* sp. identifiziert werden. In Abbildung 46 sind die potentiellen synergistischen Interaktionen der Organismen und ihrer Stoffwechselwege schematisch dargestellt. Es wird davon ausgegangen, dass das Abwasser (hA) der Firma Solvay Cellulose enthält, da dies einer der Werkstoffe der Produktion verschiedenster Materialien darstellt. Da über die Metatranskriptomanalyse das Enzym Cellulase identifiziert werden konnte, kann angenommen werden, dass die Organismen *Clostridium* sp. I und II in der Lage sind, diese einmal zu Cellobiose und auch Glukose abzubauen (Demain *et al.*,

2005). Das Enzym Cellobiose-Phosphorylase setzt Cellobiose, ein Glukose-Disaccharid, um zu Glukose. Dieses Enzym kann sowohl von Clostridien, als auch beispielsweise von *P. polymyxa* exprimiert werden (Demain *et al.*, 2005; Adlakha *et al.* 2015). Für *P. polymyxa* ist beschrieben, dass dieser zudem eine größere ATP-Ausbeute erhält, wenn Cellobiose über die Cellobiose-Phosphorylase zersetzt wird im Vergleich zur Verwertung anderer Substrate (Adlakha *et al.*, 2015). Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass in dem M3C-System mit dem hA-Abwasser *Paenibacillus* sp. oder aber auch die beiden Clostridien-Arten Cellobiose umsetzen. Das Schlüsselenzym 6-Phosphofruktokinase stellt einen Hinweis auf die Glykolyse dar, welche von allen Isolaten betrieben werden kann (Fuchs, 2014). Der Abbau der Glukose erfolgt in dem System möglicherweise über verschiedene Wege, wobei Pyruvat ein Zwischenprodukt der Glukoseoxidation darstellt. Pyruvat kann über verschiedene Wege weiter verstoffwechselt werden. So kann *E. coli* über die gemischte Säuregärung eine Reihe von Gärprodukten bilden, unter anderem Acetat über Acetyl-CoA oder auch Formiat, CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> (Fuchs, 2014). Hinweis darauf liefern die identifizierten Enzyme Pyruvat-Formiat-Lyase (Fuchs, 2014) und die Formiat-Dehydrogenasen (Popov *et al.*, 1994), welche Pyruvat zu Formiat und Acetyl-CoA umsetzen und Formiat im Anschluss in CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>. Acetyl-CoA wird dann über die Acetat-Kinase zu Acetat umgesetzt (Fuchs, 2014), welche ebenso in dem System exprimiert wird. Sowohl das Acetat, als auch das CO<sub>2</sub> und das H<sub>2</sub> können von *G. sulfurreducens*, wie bereits zuvor beschrieben, verstoffwechselt werden. Zudem kann CO<sub>2</sub> über die zusätzliche Bindung von H<sub>2</sub> von einigen Clostridien über den Wood-Ljungdahl-Weg fixiert und dabei Acetat produziert werden. Die dafür notwendigen Enzyme, die CO-Dehydrogenasen/Acetyl-CoA-Synthasen (Fuchs, 2014; Ragsdale & Pierce, 2008) konnten ebenfalls über die Transkriptomanalyse identifiziert werden. So findet möglicherweise eine Acetat-Produktion über *Clostridium* sp. I und II statt, welches wiederum von *G. sulfurreducens* metabolisiert werden kann.

*P. polymyxa* zeigt ebenfalls ein breites Spektrum an Stoffwechselwegen. So kann der Organismus Pyruvat ebenfalls zu den verschiedensten Produkten metabolisieren (Adlakha *et al.*, 2015). Adlakha *et al.* (2015) berichten über ein breites Produktspektrum des Stammes, wie zum Beispiel 2,3-Butandiol, Acetat, Formiat, H<sub>2</sub> oder CO<sub>2</sub>. Die dafür essentiellen Enzyme Acetolaktat-Synthase, Pyruvat-Formiat-Lyase, Acetat-Kinase, Phosphat-Acetyltransferase und die Formiat-Dehydrogenase (Adlakha *et al.*, 2015) finden sich ebenfalls in der Menge der höher exprimierten Gene wieder. Zudem ist der Stamm in der Lage, neben dem glykolytischen Weg, die Glukose über einen zweiten Weg in Acetat umzuwandeln, dem sog. Bifid Shunt. Hier werden 3 Acetat, aber nur 2 ATP gebildet im Vergleich zu 2 Acetat und 4 ATP. Das Enzym, welches diese Reaktion katalysiert eine Phosphoketolase (Adlakha *et al.*, 2015). Der in dieser Arbeit

isolierte Stamm *Paenibacillus* sp. könnte durchaus auch über diesen Alternativweg zur Glykolyse verfügen, da das dafür notwendige Enzym ebenfalls leicht exprimiert wird. Auch alle, für *P. polymyxa* beschriebenen Stoffwechselwege, können aufgrund der identifizierten Enzyme von dem Isolat durchgeführt werden. Ein weiteres potentiell Produkt von *Paenibacillus* sp. könnte Laktat sein, was über die L-Laktat-Dehydrogenase aus Pyruvat umgesetzt wird. Dieses Enzym ist in der Probe des Durchfluss-Experiments, neben der DMSO-Reduktase und der Formiat-Dehydrogenase, eines der höchst exprimierten Proteine. In der Literatur ist die Pyruvat-Oxidation zu Laktat ebenfalls für *P. polymyxa* beschrieben (Li *et al.*, 2013). *E. coli* ist nicht nur in der Lage anaerob Gärung zu betreiben, sondern auch anaerobe Respiration. Als Elektronendonator kann der Stamm unter anderem Laktat und als Akzeptor Nitrat oder DMSO verwenden (Nishimura *et al.*, 1983; Ingledew & Poole, 1984; Weiner *et al.*, 1992). So kann zum Beispiel Laktat mit über die L-Laktat-Dehydrogenase in Pyruvat umgewandelt werden, wobei Nitrat als Elektronendonator dient. Die Nitrat-Reduktase überträgt dabei die Elektronen auf das Nitrat (Nishimura *et al.*, 1983; Ingledew & Poole, 1984). DMSO jedoch ist ebenfalls ein geeigneter Elektronenakzeptor für *E. coli* (Weiner *et al.*, 1992). Auch diese drei Enzyme sind in großer Menge, vor allem die DMSO-Reduktase, in der Probe zu finden, was möglicherweise einen Hinweis auf anaerobe Respiration durch *E. coli* gibt. DMSO wird möglicherweise bei der Modifikation von Cellulose und damit der Herstellung von Cellulose-Acetat von der Firma Solvay verwendet. Es zeigte sich, dass die Substanz einen positiven Einfluss auf die Reaktion hat (Wang *et al.*, 2017) und wäre damit durch dessen Verwendung im Herstellungsprozess als Elektronenakzeptor für den Organismus im Abwasser verfügbar. Das durch die Nitrat-Reduktion entstehende Nitrit kann über eine Nitrit-Reduktase durch *E. coli* in Ammonium umgewandelt werden (Ingledew & Poole). Ein Hinweis darauf gibt die vorhandene Nitrit-Reduktase, die in den Proben des Durchfluss-Experiments exprimiert wird. Zudem liefert die Transkriptomanalyse Hinweise auf Buttersäuregärung und auch Stickland-Gärung durch die Clostridien *Clostridium* sp. I und II. Die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase und eine Hydrogenase sind die bedeutenden Enzyme, die Pyruvat über einige Zwischenwege in Buttersäure und CO<sub>2</sub> umwandeln (Fuchs, 2014). Beide Enzyme sind über ihre RNA in der Probe erkennbar. Bei der Stickland-Gärung werden durch proteolytische Clostridien immer Aminosäure-Paare vergärt, wie zum Beispiel Alanin und Glycin (Fuchs, 2014). In der Probe konnten eine D-Prolin-Reduktase und eine (R)-2-hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase nachgewiesen werden, welche beide in der Literatur beschrieben werden, als Enzyme, die Clostridien befähigen, Aminosäuren als Energiequelle zu nutzen (Bouillaut *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2005b).

Abbildung 46: Mögliche syntrophe Beziehung der Isolate und *G. sulfurreducens* in der M3C mit hA-Abwasser. Die Stoffwechselwege sind den einzelnen Organismen zugeordnet. • *G. sulfurreducens*, • *E. coli*, • *Clostridium* sp. I und II, • *Paenibacillus* sp..

Diese, in Abbildung 46, dargestellte metabolische Interaktion der Isolate und *G. sulfurreducens* zeigt, dass die Zusammensetzung der Organismen optimal für die Aufreinigung des Abwassers ist. Komplexe organische Substrate werden von den Isolaten in organische Säuren und CO<sub>2</sub> umgewandelt, die wiederum von *G. sulfurreducens* oder auch den Isolaten selbst verstoffwechselt werden können. Die Versorgung mit CO<sub>2</sub> und auch Acetat ist essentiell für *G. sulfurreducens*, so dass dieser mit der Anode interagieren und die Elektronen aus der Oxidation des Acetats auf die Anode übertragen kann. Eine solche Interaktion wird als mikrobielle Syntrophie bezeichnet (Morris *et al.*, 2013). Sowohl in dem Batch-, als auch in dem Durchfluss-Experiment kommt es zu einer Verdopplung der Stromdichte und auch des TOC-Verbrauchs, dies kann auf die Zugabe von *G. sulfurreducens* und die Syntrophie der Organismen zurückzuführen sein. Eine enorme Leistungssteigerung des Systems zeigt sich jedoch in der Anwendung eines Durchfluss-Systems. Der Grund dafür könnte die kontinuierliche Versorgung mit Substraten sein und auch die bessere Aufrechterhaltung des pH-Wertes. Aber auch die Adaptation des Organismus an das Abwasser kann ein Grund für diese Leistungssteigerung darstellen. Der ausgebildete Biofilm, der hauptsächlich aus Zellen von *G. sulfurreducens* besteht, ist auf der Anode des Durchfluss-Systems deutlich größer. Hier zeigt sich jedoch aber auch eine Limitierung der Anodenfläche, da eine 5000-fache Erhöhung der Zellezahl, lediglich zu einer 91-fachen Erhöhung der Stromdichte führt.

Die Isolate alleine zeigen auch eine Fähigkeit zur Stromproduktion. Über die Metatranskriptomanalyse konnten zwar einige Stoffwechselwege der Isolate identifiziert werden, jedoch bleibt unklar, wie genau sie fähig sind, Elektronen auf die Anode zu übertragen und damit Strom in der M3C zu generieren. Diese Mechanismen konnten im Zuge dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden, daher kann lediglich angenommen werden, dass die Organismen *E. coli*, *Paenibacillus* sp, *Clostridium* sp. I und *Clostridium* sp. II Elektronen über Mediatoren übertragen. Einige Organismen, wie *S. oneidensis* MR-1 produzieren Flavine, welche als Mediatoren dienen (Marsili *et al.*, 2008). Andere Bakterien hingegen nutzen exogene Huminstoffe für den Elektronentransport auf Fe<sup>3+</sup>-Oxide (Roden *et al.*, 2010). Ob die aus dem Abwasser isolierten Organismen die Fähigkeit zur Produktion endogener Mediatoren besitzen, ist unklar. Möglich ist auch, dass in dem Abwasser Huminstoffe enthalten sind, welche die Organismen als Mediator nutzen können (Peña-Méndez *et al.*, 2005), oder auch andere, bisher unbekannte Stoffe, die als solcher dienen. *E. coli* zeigt sich vereinzelt in direktem Kontakt zu der Anode, jedoch ist auch hier unklar, ob der Stamm zum direkten Elektronentransfer befähigt ist, oder nur eine syntrophe Interaktion mit *G. sulfurreducens* eingeht. In einer Arbeit von Zhang *et al.* (2008) konnte jedoch ein Elektronentransport von *E. coli* auf eine Anode, ohne Verwendung von synthetischen Mediatoren, wie Neutralrot oder Methylenblau, nachgewiesen

werden. Es wurde gezeigt, dass der Organismus in der Lage ist, solche Shuttle-Moleküle selbst zu synthetisieren und sekretieren. Zudem konnte die Stromproduktion in einem *E. coli*-Stamm, dessen TCA-Enzym-Aktivität über die Mutation von *arcA* erhöht wurde, gesteigert werden. ArcA gehört zu dem Arc (anoxic redox control) Zweikomponenten Signal Transduktions System, welches für die Wechsel von anareober auf aerobe Atmung, und auch umgekehrt, verantwortlich ist. Diese *arcA*-Mutante sekretierte einen Elektronenmediator, ein Hydroxylquinon-Derivat, welcher die Elektronen auf die Anode übertrug (Lee *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2012). Da *E. coli* aufgrund seiner Membranbeschaffenheit bisher als nicht exoelektrogen eingestuft wurde (Sugnaux *et al.*, 2013), sind diese Ergebnisse von großer Bedeutung. In einem Stamm, indem die Membran-Permeabilität über die Expression des Porins OprF aus *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 erhöht wurde, konnte ebenfalls eine Zunahme der Stromproduktion detektiert werden. So kann davon ausgegangen werden, dass durch das Einbringen dieser Poren in die Membran, mehr redoxaktive Substanzen produziert und über die Poren nach außen transportiert werden können (Yong *et al.*, 2013). Es besteht zudem die Möglichkeit, dass *E. coli* über diese Poren eine Art direkten Kontakt zu dem Elektronenakzeptor, wie der Anode, eingehen kann, um Elektronen zu übertragen (Sugnaux *et al.*, 2013). So kann auch in dieser Arbeit vermutet werden, dass der aus dem Abwasser isolierte *E. coli*-Stamm Elektronen in dieser Form auf die Anode überträgt und so mit den anderen Isolaten in der Lage ist in der M3C Strom zu produzieren.

## 6. Ausblick

### 6.1. Charakterisierung der Isolate

Die isolierten Organismen zeigten zunächst die Fähigkeit zur  $\text{Fe}^{3+}$ -Reduktion und auch in der M3C waren diese zur Stromproduktion befähigt. Über die Transkriptomanalyse konnten einige potentielle Substrate und deren zugrundeliegende Oxidation und die Stoffwechselwege der Isolate identifiziert werden. Jedoch konnte im Zuge dieser Arbeit nicht geklärt werden, welche genauen Mechanismen dem Elektronentransfer auf die Anode und auch auf das  $\text{Fe}^{3+}$ -Citrat zugrunde liegen. Zum einen kann vermutet werden, dass durch potentielle endogene Mediatoren, welche von den Bakterien selbst synthetisiert werden oder aber auch exogene Mediatoren, wie z.B. Huminstoffe, die eventuell im Abwasser vorkommen, die Elektronen auf die Akzeptoren übertragen werden. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass vereinzelt auch Isolate, vermutlich *E. coli*, in direktem Kontakt zu der Anode stehen. So könnte in diesem Fall eine Art der direkten Übertragung der Elektronen über Porine stattfinden. Jedoch ist unklar, wie genau diese Übertragung stattfindet. Somit ist es von großem Interesse, genau diese Mechanismen zu entschlüsseln und zu klären, wie Gram-positive Organismen in der Lage sind, mit einer Elektrode oder auch anderen extrazellulären Akzeptoren zu interagieren.

### 6.2. M3C zur Abwasseraufbereitung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich das Abwasser für die Aufbereitung mit einer M3C sehr gut eignet, vor allem mit den Isolaten und dem Laborstamm *G. sulfurreducens* zusammen. Mit der Umstellung auf das Durchfluss-System konnte zudem die Leistung enorm gesteigert werden. In einem nächsten Schritt wäre es wichtig, zu testen, ob das System nicht nur unter Laborbedingungen, sondern auch in der Anwendung, d.h. im Klärwerk der Firma Solvay, in der Lage ist, ähnliche Leistungen zu erbringen. Dafür wäre es jedoch notwendig einen anderen Aufbau des Reaktors zu wählen, da die verwendete M3C zum einen ein zu geringes Volumen aufweist und zum anderen eine Limitierung der Anodenfläche. Somit müsste sowohl das Reaktorvolumen, als auch die Anodenfläche vergrößert werden. Um die Leistungsfähigkeit des Systems zu steigern, sollte das Verhältnis zwischen Anodenfläche und Reaktorvolumen berücksichtigt und die Anodenfläche im Vergleich zu dem Reaktorvolumen vergrößert werden. Für eine solche Vergrößerung wären stapelbare Brennstoffzellen eine mögliche Option für die Anwendung im Klärwerk. Zudem müssen Materialien getestet werden, welche langlebig, aber auch

---

kostengünstig sind und den Einsatz der Brennstoffzelle in einem Klärwerk  
überhaupt rentabel machen.

## 7. Referenzen

- Aaron, D., C. Tsouris, C. Y. Hamilton, and A. P. Borole. 2010. 'Assessment of the Effects of Flow Rate and Ionic Strength on the Performance of an Air-Cathode Microbial Fuel Cell Using Electrochemical Impedance Spectroscopy'. *Energies* 3 (4): 592–606. doi:10.3390/en3040592.
- Adlakha, N., T. Pfau, O. Ebenhöf, and S. S. Yazdani. 2015. 'Insight into Metabolic Pathways of the Potential Biofuel Producer, *Paenibacillus polymyxa* ICGEB2008'. *Biotechnology for Biofuels* 8 (1): 159. doi:10.1186/s13068-015-0338-4.
- Aelterman, P., S. Freguia, J. Keller, W. Verstraete, and K. Rabaey. 2008. 'The Anode Potential Regulates Bacterial Activity in Microbial Fuel Cells'. *Applied Microbiology and Biotechnology* 78 (3): 409–18. doi:10.1007/s00253-007-1327-8.
- Agler-Rosenbaum, M., U. Schröder, and F. Harnisch. 2013. 'Mikroben Unter Strom'. *Biologie in Unserer Zeit* 43 (2): 96–103. doi:10.1002/biuz.201310502.
- Ahn, Youngho, and Bruce E. Logan. 2010. 'Effectiveness of Domestic Wastewater Treatment Using Microbial Fuel Cells at Ambient and Mesophilic Temperatures'. *Bioresour. Technol.* 101 (2): 469–75. doi:10.1016/j.biortech.2009.07.039.
- Aklujkar, M., M. V. Coppi, C. Leang, B. C. Kim, M. A. Chavan, L. A. Perpetua, L. Giloteaux, A. Liu, and D. E. Holmes. 2013. 'Proteins Involved in Electron Transfer to Fe(III) and Mn(IV) Oxides by *Geobacter sulfurreducens* and *Geobacter uraniireducens*'. *Microbiology (United Kingdom)* 159 (PART3). Microbiology Society: 515–35. doi:10.1099/mic.0.064089-0.
- Allen, R. M., and H. P. Bennetto. 1993. 'Microbial Fuel Cells: Electricity Production from Carbohydrates'. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 39: 27–40. doi:10.1007/BF02918975.
- Allison, D.G., B. Ruiz, C. SanJose, A. Jaspe, and P. Gilbert. 1998. 'Extracellular Products as Mediators of the Formation and Detachment of *Pseudomonas fluorescens* Biofilms'. *FEMS Microbiology Letters* 167 (2). Blackwell Publishing Ltd: 179–84. doi:10.1111/j.1574-6968.1998.tb13225.x.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. 1990. 'Basic Local Alignment Search Tool.' *Journal of Molecular Biology* 215 (3): 403–10. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- Amann, R. I., B. J. Binder, R. J. Olson, S. W. Chisholm, R. Devereux, and D. A. Stahl. 1990. 'Combination of 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes with Flow Cytometry for Analyzing Mixed Microbial Populations.' *Applied and Environmental Microbiology* 56 (6): 1919–25. <http://aem.asm.org/content/56/6/1919.abstract>.
- Anders, S., P.T. Pyl, and W. Huber. 2015. 'HTSeq — a Python Framework to

- Work with High-Throughput Sequencing Data'. *Bioinformatics* 31 (2): 166–69. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638>.
- Andreesen, J. R., H. Bahl, and G. Gottschalk. 1989. 'Introduction to the Physiology and Biochemistry of the Genus *Clostridium*'. In *Clostridia*, edited by Nigel P Minton and David J Clarke, 27–62. Boston, MA: Springer US. doi:10.1007/978-1-4757-9718-3\_2.
- Armitage, J. P. 1999. *Bacterial Tactic Responses. Advances in Microbial Physiology*. Vol. 41. doi:10.1016/S0065-2911(08)60168-X.
- Atan, S. 2015. 'Physiologisch-Molekularbiologische Charakterisierung Neuer Eisenreduzierender Mikroorganismen'. Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Angewandte Biowissenschaften-Abteilung Angewandte Biologie.
- Bajracharya, S., M. Sharma, G. Mohanakrishna, X. Dominguez Benneton, D.P.B.T.B. Strik, P.M. Sarma, and D. Pant. 2016. 'An Overview on Emerging Bioelectrochemical Systems (BESs): Technology for Sustainable Electricity, Waste Remediation, Resource Recovery, Chemical Production and beyond'. *Renewable Energy* 98: 153–70. doi:10.1016/j.renene.2016.03.002.
- Bartram, J. 2008. 'Improving on Haves and Have-Nots'. *Nature* 452 (7185). Nature Publishing Group: 283–84. <http://dx.doi.org/10.1038/452283a>.
- Beg, Q. K., A. Vazquez, J. Ernst, M. A. de Menezes, Z. Bar-Joseph, A.-L. Barabási, and Z. N. Oltvai. 2007. 'Intracellular Crowding Defines the Mode and Sequence of Substrate Uptake by *Escherichia coli* and Constrains Its Metabolic Activity'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (31). National Academy of Sciences: 12663–68. doi:10.1073/pnas.0609845104.
- Behera, M., and M. M. Ghangrekar. 2009. 'Performance of Microbial Fuel Cell in Response to Change in Sludge Loading Rate at Different Anodic Feed pH'. *Bioresour. Technol.* 100 (21): 5114–21. doi:10.1016/j.biortech.2009.05.020.
- Beliaev, A. S., D. M. Klingeman, J. A Klappenbach, L. Wu, M. F. Romine, J. M. Tiedje, K. H. Nealson, J. K. Fredrickson, and J. Zhou. 2005. 'Global Transcriptome Analysis of *Shewanella oneidensis* MR-1 Exposed to Different Terminal Electron Acceptors Global Transcriptome Analysis of *Shewanella Oneidensis* MR-1 Exposed to Different Terminal Electron Acceptors †'. *Journal of Bacteriology* 187 (20): 7138–45. doi:10.1128/JB.187.20.7138.
- Beliaev, A. S., D. A. Saffarini, J. L. McLaughlin, and D. Hunnicutt. 2001. 'MtrC, an Outer Membrane Decahem c Cytochrome Required for Metal Reduction in *Shewanella putrefaciens* MR-1'. *Molecular Microbiology* 39 (3). Blackwell Science, Ltd: 722–30. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02257.x.
- Benardini, J. N., P. A. Vaishampayan, P. Schwendner, E. Swanner, Y. Fukui, S. Osman, M. Satomi, and K. Venkateswaran. 2011. '*Paenibacillus phoenicis* Sp. Nov., Isolated from the Phoenix Lander Assembly Facility and a Subsurface Molybdenum Mine'. *International Journal of Systematic and*

- Evolutionary Microbiology* 61 (6): 1338–43. doi:10.1099/ijms.0.021428-0.
- Bhuvaneshwari, A., K. R. Navanietha, and S. Berchmans. 2013. 'Metamorphosis of Pathogen to Electrigen at the Electrode/electrolyte Interface: Direct Electron Transfer of *Staphylococcus aureus* Leading to Superior Electrocatalytic Activity'. *Electrochemistry Communications* 34 (September): 25–28. doi:10.1016/j.elecom.2013.05.013.
- Biffinger, J. C., R. Ray, B. J. Little, L. A. Fitzgerald, M. Ribbens, S. E. Finkel, and B. R. Ringeisen. 2009. 'Simultaneous Analysis of Physiological and Electrical Output Changes in an Operating Microbial Fuel Cell with *Shewanella oneidensis*'. *Biotechnology and Bioengineering* 103 (3). Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company: 524–31. doi:10.1002/bit.22266.
- BioRad. 2006. *Real-Time PCR Applications Guide. Methods*. <http://www.gene-quantification.com/real-time-pcr-guide-bio-rad.pdf>.
- Bonanni, P. S., G. D. Schrott, and J. P. Busalmen. 2012. 'A Long Way to the Electrode: How Do *Geobacter* Cells Transport Their Electrons?' *Biochemical Society Transactions* 40 (6): 1274 LP-1279. <http://www.biochemsoctrans.org/content/40/6/1274.abstract>.
- Bond, D. R., D. E. Holmes, L. M. Tender, and D. R. Lovley. 2002. 'Electrode-Reducing Microorganisms That Harvest Energy from Marine Sediments'. *Science* 295 (5554): 483 LP-485. <http://science.sciencemag.org/content/295/5554/483.abstract>.
- Bott, M. 1997. 'Anaerobic Citrate Metabolism and Its Regulation in Enterobacteria'. *Archives of Microbiology* 167 (2–3): 78–88. doi:10.1007/s002030050419.
- Bouillaut, L., W. T. Self, and A. L. Sonenshein. 2013. 'Proline-Dependent Regulation of *Clostridium difficile* Stickland Metabolism'. *Journal of Bacteriology* 195 (4): 844–54. doi:10.1128/JB.01492-12.
- Bretschger, O., A. Obraztsova, C. A. Sturm, S. C. In, Y.A. Gorby, S. B. Reed, D. E. Culley, et al. 2007. 'Current Production and Metal Oxide Reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 Wild Type and Mutants'. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (21): 7003–12. doi:10.1128/AEM.01087-07.
- Bundesministerium für Wirtschaft und Energie. 2017. 'Energiedaten : Gesamtausgabe'. <https://www.bmwi.de/BMWi/Redaktion/PDF/E/energiestatistiken-grafiken,property=pdf,bereich=bmwi2012,sprache=de,rwb=true.pdf>.
- Butler, J. E., F. Kaufmann, M. V. Coppi, C. Núñez, and D. R. Lovley. 2004. 'MacA , a Diheme c -Type Cytochrome Involved in Fe (III) Reduction by *Geobacter sulfurreducens*'. *Journal of Bacteriology* 186 (12): 4042–45. doi:10.1128/JB.186.12.4042.
- Caccavo, F., D. J. Lonergan, D. R. Lovley, M. Davis, J. F. Stolz, and M. J. McInerney. 1994. '*Geobacter sulfurreducens* Sp. Nov., a Hydrogen- and Acetate-Oxidizing Dissimilatory Metal-Reducing Microorganism'. *Applied and Environmental Microbiology* 60 (10). American Society for Microbiology

- (ASM): 3752–59. doi:0099-2240/\$04.00+0.
- Call, D., and B. E. Logan. 2008. 'Hydrogen Production in a Single Chamber Microbial Electrolysis Cell Lacking a Membrane'. *Environmental Science and Technology* 42 (9): 3401–6. doi:10.1021/es8001822.
- Chae, K. - J., M. - J. Choi, J. - W. Lee, K. - Y. Kim, and I. S. Kim. 2009. 'Effect of Different Substrates on the Performance, Bacterial Diversity, and Bacterial Viability in Microbial Fuel Cells'. *Bioresour. Technol.* 100 (14): 3518–25. doi:10.1016/j.biortech.2009.02.065.
- Chapagain, A. K., and S. Orr. 2009. 'An Improved Water Footprint Methodology Linking Global Consumption to Local Water Resources: A Case of Spanish Tomatoes'. *Journal of Environmental Management* 90 (2): 1219–28. doi:10.1016/j.jenvman.2008.06.006.
- Chaudhuri, S. K., and D. R. Lovley. 2003. 'Electricity Generation by Direct Oxidation of Glucose in Mediatorless Microbial Fuel Cells'. *Nature Biotechnology* 21 (10). Nature Publishing Group: 1229–32. doi:10.1038/nbt867.
- Cheng, S., H. Liu, and B. E. Logan. 2005. 'Increasing Power Generation in a Continuous Flow Mfc by Advective Flow through the Anode and Reduced Electrode Spacing'. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 230 (7): U1758–59.
- Cheng, S., H. Liu, and B. E. Logan. 2006. 'Increased Performance of Single-Chamber Microbial Fuel Cells Using an Improved Cathode Structure'. *Electrochemistry Communications* 8 (3): 489–94. doi:10.1016/j.elecom.2006.01.010.
- Cheng, S., D. Xing, D. F. Call, and B. E. Logan. 2009. 'Direct Biological Conversion of Electrical Current into Methane by Electromethanogenesis'. *Environmental Science & Technology* 43 (10). American Chemical Society: 3953–58. doi:10.1021/es803531g.
- Childers, S. E., S. Ciuffo, and D. R. Lovley. 2002. 'Geobacter metallireducens Accesses Insoluble Fe(III) Oxide by Chemotaxis'. *Nature* 416 (6882). Nature Publishing Group: 767–69. doi:10.1038/416767a.
- Chung, K., and S. Okabe. 2009. 'Continuous Power Generation and Microbial Community Structure of the Anode Biofilms in a Three-Stage Microbial Fuel Cell System'. *Applied Microbiology and Biotechnology* 83 (5): 965–77. doi:10.1007/s00253-009-1990-z.
- Dalla Vecchia, E., E. I. Suvorova, J. Maillard, and R. Bernier-Latmani. 2014. 'Fe(III) Reduction during Pyruvate Fermentation by *Desulfotomaculum reducens* Strain MI-1'. *Geobiology* 12 (1): 48–61. doi:10.1111/gbi.12067.
- Davidson, A. L., and J. Chen. 2004. 'ATP-Binding Cassette Transporters in Bacteria'. *Annual Review of Biochemistry* 73 (1). Annual Reviews: 241–68. doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.073626.

- de Bruijn, F. 2005. 'The Current Status of Fuel Cell Technology for Mobile and Stationary Applications'. *Green Chemistry* 7 (3): 132. doi:10.1039/b415317k.
- De Vos, P., G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K.-H. Schleifer, and W. B. Whitman. 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology - Vol 3: The Firmicutes*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nded. Vol. 3. Springer-Verlag New York. doi:10.1007/978-0-387-68489-5.
- DeLong, E. F., G. S. Wickham, and N. R. Pace. 1989. 'Phylogenetic Stains: Ribosomal RNA-Based Probes for the Identification of Single Cells'. *Science* 243 (4896): 1360 LP-1363. <http://science.sciencemag.org/content/243/4896/1360.abstract>.
- Demain, A. L., M. Newcomb, and J. H. D. Wu. 2005. 'Cellulase, Clostridia, and Ethanol'. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 69 (1). American Society for Microbiology: 124–54. doi:10.1128/MMBR.69.1.124-154.2005.
- Devriese, L. U. C., M. Baele, and P. Butaye. 2006. 'The Genus *Enterococcus* : Taxonomy'. *Prokaryotes* 4. New York, NY: Springer US: 163–74. doi:10.1007/0-387-30744-3\_5.
- Di Lorenzo, M., K. Scott, T. P. Curtis, and I. M. Head. 2010. 'Effect of Increasing Anode Surface Area on the Performance of a Single Chamber Microbial Fuel Cell'. *Chemical Engineering Journal* 156 (1): 40–48. doi:10.1016/j.cej.2009.09.031.
- Ding, Y. H. R., K. K. Hixson, M. A. Aklujkar, M. S. Lipton, R. D. Smith, D. R. Lovley, and T. Mester. 2008. 'Proteome of *Geobacter sulfurreducens* Grown with Fe(III) Oxide or Fe(III) Citrate as the Electron Acceptor'. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1784 (12): 1935–41. doi:10.1016/j.bbapap.2008.06.011.
- Dobbin, P. S., J. P. Carter, C. García-Salamanca San Juan, M. von Hobe, A. K. Powell, and D. J. Richardson. 1999. 'Dissimilatory Fe(III) Reduction by *Clostridium beijerinckii* Isolated from Freshwater Sediment Using Fe(III) Maltol Enrichment'. *FEMS Microbiology Letters* 176 (1). Blackwell Publishing Ltd: 131–38. doi:10.1111/j.1574-6968.1999.tb13653.x.
- Dohnalkova, A. C., M. J. Marshall, B. W. Arey, K. H. Williams, E. C. Buck, and J. K. Fredrickson. 2011. 'Imaging Hydrated Microbial Extracellular Polymers: Comparative Analysis by Electron Microscopy'. *Applied and Environmental Microbiology* 77 (4): 1254–62. doi:10.1128/AEM.02001-10.
- Dolch, K., J. Danzer, T. Kabbeck, B. Bierer, J. Erben, A. H. Förster, J. Maisch, P. Nick, and S. Kerzenmacher. 2014. 'Characterization of Microbial Current Production as a Function of Microbe–electrode-Interaction'. *Bioresour. Technol.* 157 (April): 284–92. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.112.
- Dolch, K., J. Wuske, and J. Gescher. 2015. 'Genomic Barcode-Based Analysis of Exoelectrogens in Wastewater Biofilms Grown on Anode Surfaces'. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 26 (3): 511–20. doi:10.4014/jmb.1510.10102.

- Dong, Y., Y. Qu, W. He, Y. Du, J. Liu, X. Han, and Y. Feng. 2015. 'A 90-Liter Stackable Baffled Microbial Fuel Cell for Brewery Wastewater Treatment Based on Energy Self-Sufficient Mode'. *Bioresource Technology* 195 (November): 66–72. doi:10.1016/j.biortech.2015.06.026.
- DWA. 2011. 'Leistungsvergleich Kommunaler Kläranlagen 2011 - Stromverbrauch: 4.300 Kläranlagen Unter Der Lupe'.
- Edenhofer, O., R. Pichs-Madruga, Y. Sokona, K. Seyboth, P. Eickemeier, P. Matschoss, G. Hansen, et al. 2011. 'IPCC, 2011: Summary for Policymakers. In: IPCC Special Report on Renewable Energy Sources and Climate Change Mitigation'. *Cambridge University Press*. doi:10.5860/CHOICE.49-6309.
- Elias, S., and E. Banin. 2012. 'Multi-Species Biofilms: Living with Friendly Neighbors'. *FEMS Microbiology Reviews*. doi:10.1111/j.1574-6976.2012.00325.x.
- Esteve-Núñez, A., M. Rothermich, M. Sharma, and D. R. Lovley. 2005. 'Growth of *Geobacter sulfurreducens* under Nutrient-Limiting Conditions in Continuous Culture'. *Environmental Microbiology* 7 (5): 641–48. doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00731.x.
- Fonseca, B. M., C. M. Paquete, S. E. Neto, I. Pacheco, C. M. Soares, and R. O. Louro. 2012. 'Mind the Gap: Cytochrome Interactions Reveal Electron Pathways across the Periplasm of *Shewanella oneidensis* MR-1'. *Biochemical Journal* 449 (1): 101 LP-108. <http://www.biochemj.org/content/449/1/101.abstract>.
- Fredrickson, J. K., M. F. Romine, A. S. Beliaev, J. M. Auchtung, M. E. Driscoll, T. S. Gardner, K. H. Nealson, et al. 2008. 'Towards Environmental Systems Biology of *Shewanella*'. *Nat Rev Micro* 6 (8). Nature Publishing Group: 592–603. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1947>.
- Fricke, K. 2009. 'Energieeffizienz Kommunaler Kläranlagen'. *Umweltbundesamt, Dessau*, 10. <http://opus.kobv.de/zlb/volltexte/2009/8010/>.
- Fuchs, G. 2014. *Allgemeine Mikrobiologie*. Edited by Georg Fuchs. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. doi:10.1055/b-0034-95319.
- Garrity, G. M. 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 2: The Proteobacteria*. 2nded. Springer-Verlag US. doi:10.1007/0-387-28022-7.
- Gerritsen, J., S. Fuentes, W. Grievink, L. van Niftrik, B. J. Tindall, H. M. Timmerman, G. T. Rijkers, and H. Smidt. 2014. 'Characterization of *Romboutsia ilealis* Gen. Nov., Sp. Nov., Isolated from the Gastro-Intestinal Tract of a Rat, and Proposal for the Reclassification of Five Closely Related Members of the Genus *Clostridium* into the Genera *Romboutsia* Gen. Nov., Intestinib'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64 (PART 5): 1600–1616. doi:10.1099/ijs.0.059543-0.
- Gil, G. C., I. S. Chang, B. H. Kim, M. Kim, J. K. Jang, H. S. Park, and H. J. Kim. 2003. 'Operational Parameters Affecting the Performance of a Mediator-Less Microbial Fuel Cell'. *Biosensors and Bioelectronics* 18 (4): 327–34.

doi:10.1016/S0956-5663(02)00110-0.

- Gimkiewicz, C., R. Hegner, M. F. Gutensohn, C. Koch, and F. Harnisch. 2017. 'Study of Electrochemical Reduction of CO<sub>2</sub> for Future Use in Secondary Microbial Electrochemical Technologies'. *ChemSusChem* 10 (5): 958–67. doi:10.1002/cssc.201601675.
- Golitsch, F. 2016. 'Entwicklung Bioelektrochemischer Systeme Für Die Untersuchung von Elektrodenabhängigen Konversionsprozessen'. Karlsruhe Institut für Technologie (KIT), Institut für Angewandte Biowissenschaften-Abteilung Angewandte Biologie.
- Grady, E. N., J. MacDonald, L. Liu, A. Richman, and Z.-C. Yuan. 2016. 'Current Knowledge and Perspectives of *Paenibacillus*: A Review'. *Microbial Cell Factories* 15 (1): 203. doi:10.1186/s12934-016-0603-7.
- Gude, V. G. 2016. 'Wastewater Treatment in Microbial Fuel Cells - An Overview'. *Journal of Cleaner Production*. doi:10.1016/j.jclepro.2016.02.022.
- Ha, P. T., T. K. Lee, B. E. Rittmann, J. Park, and I. S. Chang. 2012. 'Treatment of Alcohol Distillery Wastewater Using a *Bacteroidetes*-Dominant Thermophilic Microbial Fuel Cell'. *Environmental Science and Technology* 46 (5): 3022–30. doi:10.1021/es203861v.
- Hartshorne, R. S., C. L. Reardon, D. Ross, J. Nuester, T. A. Clarke, A. J. Gates, P. C. Mills, et al. 2009. 'Characterization of an Electron Conduit between Bacteria and the Extracellular Environment'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (52): 22169–74. doi:10.1073/pnas.0900086106.
- Häßler, T., D. Schieder, R. Pfaller, M. Faulstich, and V. Sieber. 2012. 'Enhanced Fed-Batch Fermentation of 2,3-Butanediol by *Paenibacillus polymyxa* DSM 365'. *Bioresource Technology* 124 (November): 237–44. doi:10.1016/j.biortech.2012.08.047.
- Hau, H. H., and J. A. Gralnick. 2007. 'Ecology and Biotechnology of the Genus *Shewanella*'. *Annual Review of Microbiology* 61 (1). Annual Reviews: 237–58. doi:10.1146/annurev.micro.61.080706.093257.
- He, H., S. J. Yuan, Z. H. Tong, Y. X. Huang, Z. Q. Lin, and H. Qi. Yu. 2014. 'Characterization of a New Electrochemically Active Bacterium, *Lysinibacillus sphaericus* D-8, Isolated with a WO<sub>3</sub> Nanocluster Probe'. *Process Biochemistry* 49 (2): 290–94. doi:10.1016/j.procbio.2013.11.008.
- Heidelberg, J. F., I. T. Paulsen, K. E. Nelson, E. J. Gaidos, W. C. Nelson, T. D. Read, J. A. Eisen, et al. 2002. 'Genome Sequence of the Dissimilatory Metal Ion-Reducing Bacterium *Shewanella oneidensis*'. *Nat Biotech* 20 (11). Nature Publishing Group: 1118–23. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt749>.
- Heidrich, E. S., T. P. Curtis, and J. Dolfig. 2011. 'Determination of the Internal Chemical Energy of Wastewater'. *Environmental Science & Technology* 45 (2). American Chemical Society: 827–32. doi:10.1021/es103058w.
- Herbert-Guillou, D., B. Tribollet, and D. Festy. 2001. 'Influence of the

- Hydrodynamics on the Biofilm Formation by Mass Transport Analysis'. *Bioelectrochemistry* 53 (1): 119–25. doi:10.1016/S0302-4598(00)00121-5.
- Holmes, D. E., D. R. Bond, R. A. O'Neil, C. E. Reimers, L. R. Tender, and D. R. Lovley. 2004. 'Microbial Communities Associated with Electrodes Harvesting Electricity from a Variety of Aquatic Sediments'. *Microbial Ecology* 48 (2): 178–90. doi:10.1007/s00248-003-0004-4.
- Holmes, D. E., S. K. Chaudhuri, K. P. Nevin, T. Mehta, B. A. Methé, A. Liu, J. E. Ward, T. L. Woodard, J. Webster, and D. R. Lovley. 2006. 'Microarray and Genetic Analysis of Electron Transfer to Electrodes in *Geobacter sulfurreducens*'. *Environmental Microbiology* 8 (10). Blackwell Publishing Ltd: 1805–15. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01065.x.
- Hosang, W. 2013. *Abwassertechnik*. Vieweg & Teubner. 9. Edition, Softcover reprint of the original 9th ed. 1992, ISBN: 9783322895455
- IEA, International Energy Agency. 2013. *Resources to Reserves 2013 - Oil, Gas and Coal Technologies for the Energy Markets of the Future*. doi:10.1787/9789264090705-en.
- IEA, International Energy Agency. 2016a. 'Key World Energy Statistics'. *Statistics*, 80. doi:10.1787/key\_energ\_stat-2016-en.
- IEA, International Energy Agency. 2016b. 'World Energy Outlook 2016 (Executive Summary)'. *lea Weo*. doi:http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/WEB\_WorldEnergyOutlook2015ExecutiveSummaryEnglishFinal.pdf.
- Ieropoulos, I., J. Winfield, and J. Greenman. 2010. 'Effects of Flow-Rate, Inoculum and Time on the Internal Resistance of Microbial Fuel Cells'. *Bioresourc Technology* 101 (10): 3520–25. doi:10.1016/j.biortech.2009.12.108.
- Ingledeu, W. J., and R. K. Poole. 1984. 'The Respiratory Chains of *Escherichia coli*'. *Microbiological Reviews* 48 (3): 222–71. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC373010/pdf/microrev00061-0046.pdf>.
- IPCC. 2014. 'Summary for Policymakers'. *Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. doi:10.1017/CBO9781107415324.
- Izallalen, M., R. Mahadevan, A. Burgard, B. Postier, R. Didonato, J. Sun, C. H. Schilling, and D. R. Lovley. 2008. 'Geobacter sulfurreducens Strain Engineered for Increased Rates of Respiration'. *Metabolic Engineering* 10 (5): 267–75. doi:10.1016/j.ymben.2008.06.005.
- Jadhav, G. S., and M. M. Ghangrekar. 2009. 'Performance of Microbial Fuel Cell Subjected to Variation in pH, Temperature, External Load and Substrate Concentration'. *Bioresourc Technology* 100 (2): 717–23. doi:10.1016/j.biortech.2008.07.041.

- Jia, Y.-H., H.-T. Tran, D.-H. Kim, S.-J. Oh, D.-H. Park, R.-H. Zhang, and D.-H. Ahn. 2008. 'Simultaneous Organics Removal and Bio-Electrochemical Denitrification in Microbial Fuel Cells'. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 31 (4): 315–21. doi:10.1007/s00449-007-0164-6.
- Jiang, X., J. Hu, E. R. Petersen, L. A. Fitzgerald, C. S. Jackan, A. M. Lieber, B. R. Ringeisen, C. M. Lieber, and J. C. Biffinger. 2013. 'Probing Single- to Multi-Cell Level Charge Transport in *Geobacter sulfurreducens* DL-1' 4 (November). Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.: 2751. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms3751>.
- Juang, D. F., P. C. Yang, H. Y. Chou, and L. J. Chiu. 2011. 'Effects of Microbial Species, Organic Loading and Substrate Degradation Rate on the Power Generation Capability of Microbial Fuel Cells'. *Biotechnology Letters* 33 (11). Springer Netherlands: 2147–60. doi:10.1007/s10529-011-0690-9.
- Jung, S., and J. M. Regan. 2011. 'Influence of External Resistance on Electrogenesis, Methanogenesis, and Anode Prokaryotic Communities in Microbial Fuel Cells'. *Applied and Environmental Microbiology* 77 (2): 564–71. doi:10.1128/AEM.01392-10.
- Kempf, V. A. J., K. Trebesius, and I. B. Autenrieth. 2000. 'Fluorescent In Situ Hybridization Allows Rapid Identification of Microorganisms in Blood Cultures.' *Journal of Clinical Microbiology* 38 (2): 830–38. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=86216&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Kim, B.-C., and D. R. Lovley. 2008. 'Investigation of Direct vs. Indirect Involvement of the *c*-Type Cytochrome MacA in Fe(III) Reduction by *Geobacter sulfurreducens*'. *FEMS Microbiology Letters* 286 (1): 39–44. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01252.x>.
- Kim, B. H., H. S. Park, H. J. Kim, G. T. Kim, I. S. Chang, J. Lee, and N. T. Phung. 2004. 'Enrichment of Microbial Community Generating Electricity Using a Fuel-Cell-Type Electrochemical Cell'. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63 (6): 672–81. doi:10.1007/s00253-003-1412-6.
- Kim, G. T., M. S. Hyun, I. S. Chang, H. J. Kim, H. S. Park, B. H. Kim, S. D. Kim, J. W T Wimpenny, and Andrew J. Weightman. 2005a. 'Dissimilatory Fe(III) Reduction by an Electrochemically Active Lactic Acid Bacterium Phylogenetically Related to *Enterococcus gallinarum* Isolated from Submerged Soil'. *Journal of Applied Microbiology* 99 (4): 978–87. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02514.x.
- Kim, H. J., H. S. Park, M. S. Hyun, I. S. Chang, M. Kim, and B. H. Kim. 2002. 'A Mediator-Less Microbial Fuel Cell Using a Metal Reducing Bacterium, *Shewanella putrefaciens*'. *Enzyme and Microbial Technology* 30 (2): 145–52. doi:10.1016/S0141-0229(01)00478-1.
- Kim, J., D. Darley, and W. Buckel. 2005b. '2-Hydroxyisocaproyl-CoA Dehydratase and Its Activator from *Clostridium difficile*'. *FEBS Journal* 272 (2): 550–61. doi:10.1111/j.1742-4658.2004.04498.x.

- Kim, J. R., Y. Zuo, J. M. Regan, and B. E. Logan. 2008. 'Analysis of Ammonia Loss Mechanisms in Microbial Fuel Cells Treating Animal Wastewater'. *Biotechnology and Bioengineering* 99 (5): 1120–27. doi:10.1002/bit.21687.
- Kim, M. S., and Y. J. Lee. 2010. 'Optimization of Culture Conditions and Electricity Generation Using *Geobacter sulfurreducens* in a Dual-Chambered Microbial Fuel-Cell'. In *International Journal of Hydrogen Energy*, 35:13028–34. doi:10.1016/j.ijhydene.2010.04.061.
- Kotloski, N. J., and J. A. Gralnick. 2013. 'Flavin Electron Shuttles Dominate Extracellular Electron Transfer by *Shewanella oneidensis*'. *mBio* 4 (1). doi:10.1128/mBio.00553-12.
- Krieg, N.R., Ludwig, W., Whitman, W., Hedlund, B.P., Paster, B.J., Staley, J.T., Ward, N., Brown, D., Parte A. 2010. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology - Vol 4: Bacteroidetes*. Springer-Verlag New York Inc. 4th ed. Springer-Verlag New York. doi:10.1007/978-0-387-68572-4.
- Kumar, R., L. Singh, and A. W. Zularisam. 2016. 'Exoelectrogens: Recent Advances in Molecular Drivers Involved in Extracellular Electron Transfer and Strategies Used to Improve It for Microbial Fuel Cell Applications'. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. doi:10.1016/j.rser.2015.12.029.
- Küsel, K., H. C. Pinkart, H. L. Drake, and R. Devereux. 1999. 'Acetogenic and Sulfate-Reducing Bacteria Inhabiting the Rhizoplane and Deep Cortex Cells of the Sea Grass *Halodule wrightii*'. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (11): 5117–23.
- Langmead, B., and S. L. Salzberg. 2012. 'Fast Gapped-Read Alignment with Bowtie 2'. *Nat Meth* 9 (4). Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.: 357–59. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1923>.
- Lanthier, M., K. B. Gregory, and D. R. Lovley. 2008. 'Growth with High Planktonic Biomass in *Shewanella oneidensis* Fuel Cells'. *FEMS Microbiology Letters* 278 (1): 29–35. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00964.x.
- Lapinonnière, L., M. Picot, and F. Barrière. 2012. 'Enzymatic versus Microbial Bio-Catalyzed Electrodes in Bio-Electrochemical Systems'. *ChemSusChem* 5 (6). WILEY-VCH Verlag: 995–1005. doi:10.1002/cssc.201100835.
- Leang, C., M. V. Coppi, and D. R. Lovley. 2003. 'OmcB, a c-Type Polyheme Cytochrome, Involved in Fe(III) Reduction in *Geobacter sulfurreducens*'. *Journal of Bacteriology* 185 (7): 2096–2103. doi:10.1128/JB.185.7.2096-2103.2003.
- Leang, C., X. Qian, T. Mester, and D. R. Lovley. 2010. 'Alignment of the c-Type Cytochrome OmcS along Pili of *Geobacter sulfurreducens*'. *Applied and Environmental Microbiology* 76 (12): 4080–84. doi:10.1128/AEM.00023-10.
- Lee, Y. S., J. S. Han, Y. Jeon, and D. S. Hwang. 2001. 'The Arc Two-Component Signal Transduction System Inhibits *In Vitro* *Escherichia coli* Chromosomal Initiation'. *Journal of Biological Chemistry* 276 (13). American Society for

- Biochemistry and Molecular Biology: 9917–23. doi:10.1074/jbc.M008629200.
- Lefebvre, O., A. Al-Mamun, and H. Y. Ng. 2008. 'A Microbial Fuel Cell Equipped with a Biocathode for Organic Removal and Denitrification'. *Water Science and Technology* 58 (4): 881–85. doi:10.2166/wst.2008.343.
- Leung, J. W., L. L. Yan, T. Desta, E. Libby, J. F. Inciardi, and K. Lam. 1998. 'Is There a Synergistic Effect between Mixed Bacterial Infection in Biofilm Formation on Biliary Stents?' *Gastrointestinal Endoscopy* 48 (3): 250–57. doi:10.1016/S0016-5107(98)70186-5.
- Levar, C. E., C. L. Hoffman, A. J. Dunshee, B. M. Toner, and D. R. Bond. 2017. 'Redox Potential as a Master Variable Controlling Pathways of Metal Reduction by *Geobacter sulfurreducens*'. *The ISME Journal* 11 (3): 741–52. doi:10.1038/ismej.2016.146.
- Li, H., B. Handsaker, A. Wysoker, T. Fennell, J. Ruan, N. Homer, G. Marth, G. Abecasis, and R. Durbin. 2009. 'The Sequence Alignment/Map Format and SAMtools'. *Bioinformatics* 25 (16): 2078–79. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>.
- Li, J., W. Wang, Y. Ma, and A.-P. Zeng. 2013. 'Medium Optimization and Proteome Analysis of (R,R)-2,3-Butanediol Production by *Paenibacillus polymyxa* ATCC 12321'. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (2): 585–97. doi:10.1007/s00253-012-4331-6.
- Liu, C., J. M. Zachara, Y. A. Gorby, J. E. Szecsody, and C. F. Brown. 2001. 'Microbial Reduction of Fe(III) and Sorption/precipitation of Fe(II) on *Shewanella putrefaciens* Strain CN32'. *Environmental Science and Technology* 35 (7): 1385–93. doi:10.1021/es0015139.
- Liu, H., and B. E. Logan. 2004. 'Electricity Generation Using an Air-Cathode Single Chamber Microbial Fuel Cell in the Presence and Absence of a Proton Exchange Membrane'. *Environmental Science & Technology* 38 (14). American Chemical Society: 4040–46. doi:10.1021/es0499344.
- Liu, H., R. Ramnarayanan, and B.E. Logan. 2004. 'Production of Electricity during Wastewater Treatment Using a Single Chamber Microbial Fuel Cell'. *Environmental Science & Technology* 38 (7). American Chemical Society: 2281–85. doi:10.1021/es034923g.
- Liu, J., Y. C. Yong, H. Song, and C. M. Li. 2012. 'Activation Enhancement of Citric Acid Cycle to Promote Bioelectrocatalytic Activity of ArcA Knockout *Escherichia coli* toward High-Performance Microbial Fuel Cell'. *ACS Catalysis* 2 (8): 1749–52. doi:10.1021/cs3003808.
- Liu, Y., Z. Wang, J. Liu, C. Levar, M. J. Edwards, J. T. Babauta, D. W. Kennedy, et al. 2014. 'A Trans-Outer Membrane Porin-Cytochrome Protein Complex for Extracellular Electron Transfer by *Geobacter sulfurreducens* PCA'. *Environmental Microbiology Reports* 6 (6): 776–85. doi:10.1111/1758-2229.12204.
- Lloyd, Jon R, Ching Leang, Allison L Hodges Myerson, Maddalena V Coppi,

- Stacey Cuifo, Barb Methe, Steven J Sandler, and Derek R Lovley. 2003. 'Biochemical and Genetic Characterization of PpcA, a Periplasmic c-Type Cytochrome in *Geobacter sulfurreducens*'. *Biochemical Journal* 369 (1): 153–61. doi:10.1042/bj20020597.
- Logan, B. E., B. Hamelers, R. Rozendal, U. Schröder, J. Keller, S. Freguia, P. Aelterman, W. Verstraete, and K. Rabaey. 2006. 'Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology'. *Environmental Science and Technology* 40 (17): 5181–92. doi:10.1021/es0605016.
- Logan, B. E., and J. M. Regan. 2006. 'Electricity-Producing Bacterial Communities in Microbial Fuel Cells'. *Trends in Microbiology* 14 (12): 512–18. doi:10.1016/j.tim.2006.10.003.
- Logan, Bruce E. 2009. 'Exoelectrogenic Bacteria That Power Microbial Fuel Cells.' *Nature Reviews. Microbiology* 7 (5): 375–81. doi:10.1038/nrmicro2113.
- Lonergan, D. J., H. L. Jenter, J. D. Coates, E. J. P. Phillips, T. M. Schmidt, and D. R. Lovley. 1996. 'Phylogenetic Analysis of Dissimilatory Fe(III)-Reducing Bacteria'. *Journal of Bacteriology* 178 (8): 2402–8. doi:10.1128/JB.178.8.2402-2408.1996.
- Love, M. I., W. Huber, and S. Anders. 2014. 'Moderated Estimation of Fold Change and Dispersion for RNA-Seq Data with DESeq2'. *Genome Biology* 15 (12): 550. doi:10.1186/s13059-014-0550-8.
- Lovley, D. R. 1991. 'Dissimilatory Fe ( III ) and Mn ( IV ) Reduction' 55 (2): 259–87.
- Lovley, D. R. 1991. 2006. 'Bug Juice: Harvesting Electricity with Microorganisms'. *Nat Rev Micro* 4 (7): 497–508. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1442>.
- Lowy, D. A., L. M. Tender, J. G . Zeikus, D. H. Park, and D. R. Lovley. 2006. 'Harvesting Energy from the Marine Sediment-Water Interface II. Kinetic Activity of Anode Materials'. *Biosensors and Bioelectronics* 21 (11): 2058–63. doi:10.1016/j.bios.2006.01.033.
- Lu, L., N. Ren, X. Zhao, H. Wang, D. Wu, and D. Xing. 2011. 'Hydrogen Production, Methanogen Inhibition and Microbial Community Structures in Psychrophilic Single-Chamber Microbial Electrolysis Cells'. *Energy & Environmental Science* 4 (4): 1329. doi:10.1039/c0ee00588f.
- Lu, L., D. Xing, and N. Ren. 2012a. 'Pyrosequencing Reveals Highly Diverse Microbial Communities in Microbial Electrolysis Cells Involved in Enhanced H<sub>2</sub> Production from Waste Activated Sludge'. *Water Research* 46 (7): 2425–34. doi:10.1016/j.watres.2012.02.005.
- Lu, L., D. Xing, N. Ren, and B. E. Logan. 2012b. 'Syntrophic Interactions Drive the Hydrogen Production from Glucose at Low Temperature in Microbial Electrolysis Cells'. *Bioresour Technol* 124: 68–76. doi:10.1016/j.biortech.2012.08.040.
- Luo, J., J. Yang, H. He, T. Jin, L. Zhou, M. Wang, and M. Zhou. 2013. 'A New Electrochemically Active Bacterium Phylogenetically Related to *Tolomonas*

- osonensis* and Power Performance in MFCs'. *Bioresource Technology* 139: 141–48. doi:10.1016/j.biortech.2013.04.031.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko, P.V. Dunlap, and D.P. Clark. 2008. *Microbiology of Microorganisms*. 12th, Pear ed. BROCK.
- Mahadevan, R., D. R. Bond, J. E. Butler, M. V. Coppi, B. O. Palsson, C. H. Schilling, and D. R. Lovley. 2006. 'Characterization of Metabolism in the Fe ( III ) -Reducing Organism *Geobacter sulfurreducens* by Constraint-Based Modeling Characterization of Metabolism in the Fe(III) -Reducing Organism *Geobacter sulfurreducens* by Constraint-Based Modeling †'. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (2): 1558–68. doi:10.1128/AEM.72.2.1558.
- Malvankar, N. S., T. Mester, M. T. Tuominen, and D. R. Lovley. 2012. 'Supercapacitors Based on c-Type Cytochromes Using Conductive Nanostructured Networks of Living Bacteria'. *ChemPhysChem* 13 (2): 463–68. doi:10.1002/cphc.201100865.
- Mansoorian, H. J., A. H. Mahvi, A. J. Jafari, and N. Khanjani. 2016. 'Evaluation of Dairy Industry Wastewater Treatment and Simultaneous Bioelectricity Generation in a Catalyst-Less and Mediator-Less Membrane Microbial Fuel Cell'. *Journal of Saudi Chemical Society* 20 (1): 88–100. doi:10.1016/j.jscs.2014.08.002.
- Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Vancanneyt, and K. H. Schleifer. 1996. 'Application of a Suite of 16S rRNA-Specific Oligonucleotide Probes Designed to Investigate Bacteria of the Phylum Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides in the Natural Environment'. *Microbiology* 142 (5). Microbiology Society: 1097–1106. doi:10.1099/13500872-142-5-1097.
- Marritt, S. J., T. G. Lowe, J. Bye, D. G. G. McMillan, L. Shi, J. Fredrickson, J. Zachara, et al. 2012. 'A Functional Description of CymA, an Electron-Transfer Hub Supporting Anaerobic Respiratory Flexibility in *Shewanella*'. *Biochemical Journal* 444 (3): 465 LP-474. <http://www.biochemj.org/content/444/3/465.abstract>.
- Marshall, C. W., D. E. Ross, E. B. Fichot, R. S. Norman, and H. D. May. 2012. 'Electrosynthesis of Commodity Chemicals by an Autotrophic Microbial Community'. *Applied and Environmental Microbiology* 78 (23): 8412–20. doi:10.1128/AEM.02401-12.
- Marsili, E., D. B. Baron, I. D. Shikhare, D. Coursolle, J. A. Gralnick, and D. R. Bond. 2008. '*Shewanella* Secretes Flavins That Mediate Extracellular Electron Transfer'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (10): 3968–73. doi:10.1073/pnas.0710525105.
- Marsili, E., J. Sun, and D. R. Bond. 2010. 'Voltammetry and Growth Physiology of *Geobacter sulfurreducens* Biofilms as a Function of Growth Stage and Imposed Electrode Potential'. *Electroanalysis* 22 (7–8): 865–74. doi:10.1002/elan.200800007.
- McInerney, M. J., L. Rohlin, H. Mouttaki, U. Kim, R. S. Krupp, L. Rios-Hernandez, J. Sieber, et al. 2007. 'The Genome of *Syntrophus aciditrophicus*: Life at the

- Thermodynamic Limit of Microbial Growth'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 104 (18): 7600–7605. doi:10.1073/pnas.0610456104.
- McLean, J. S., G. Wanger, Y. A. Gorby, M. Wainstein, J. McQuaid, S. Ishii, O. Bretschger, H. Beyenal, and K. H. Nealson. 2010. 'Quantification of Electron Transfer Rates to a Solid Phase Electron Acceptor through the Stages of Biofilm Formation from Single Cells to Multicellular Communities'. *Environmental Science & Technology* 44 (7). American Chemical Society: 2721–27. doi:10.1021/es903043p.
- Mehta, T., M. V. Coppi, S. E. Childers, and D. R. Lovley. 2005. 'Outer Membrane c-Type Cytochromes Required for Fe (III) and Mn (IV) Oxide Reduction in *Geobacter sulfurreducens*'. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (12): 8634–41. doi:10.1128/AEM.71.12.8634.
- Méthé, B. A., K. E. Nelson, J. A. Eisen, I. T. Paulsen, W. Nelson, J. F. Heidelberg, D. Wu, et al. 2003. 'Genome of *Geobacter sulfurreducens*: Metal Reduction in Subsurface Environments.' *Science (New York, N.Y.)* 302 (5652): 1967–69. doi:10.1126/science.1088727.
- Min, B., and B. E. Logan. 2004. 'Continuous Electricity Generation from Domestic Wastewater and Organic Substrates in a Flat Plate Microbial Fuel Cell'. *Environmental Science & Technology* 38 (21). American Chemical Society: 5809–14. doi:10.1021/es0491026.
- Moomaw, W., F. Yamba, M. Kamimoto, L. Maurice, J. Nyboer, K. Urama, and T. Weir. 2011. 'Introduction: Renewable Energy and Climate Change'. *IPCC Special Report on Renewable Energy Sources and Climate Change Mitigation*.
- Morris, Brandon E L, Ruth Henneberger, Harald Huber, and Christine Moissl-Eichinger. 2013. 'Microbial Syntrophy: Interaction for the Common Good'. *FEMS Microbiology Reviews* 37 (3): 384–406. <http://dx.doi.org/10.1111/1574-6976.12019>.
- Morris, J. M., and S. Jin. 2007. 'Feasibility of Using Microbial Fuel Cell Technology for Bioremediation of Hydrocarbons in Groundwater'. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 43 (1): 18–23. doi:10.1080/10934520701750389.
- Myers, C. R., and J. M. Myers. 1997. 'Cloning and Sequence of *cymA*, a Gene Encoding a Tetraheme Cytochrome c Required for Reduction of Iron(III), Fumarate, and Nitrate by *Shewanella putrefaciens* MR-1. Cloning and Sequence of *cymA*, a Gene Encoding a Tetraheme Cytochrome c Required for R' 179 (lii): 1143–52.
- Nandy, A., V. Kumar, and P. P. Kundu. 2013. 'Utilization of Proteinaceous Materials for Power Generation in a Mediatorless Microbial Fuel Cell by a New Electrogenic Bacteria *Lysinibacillus sphaericus* VA5'. *Enzyme and Microbial Technology* 53 (5): 339–44. doi:10.1016/j.enzmictec.2013.07.006.
- Nevin, K. P., B. C. Kim, R. H. Glaven, J. P. Johnson, T. L. Woodward, B. A.

- Méthé, R. J. Didonato, et al. 2009. 'Anode Biofilm Transcriptomics Reveals Outer Surface Components Essential for High Density Current Production in *Geobacter sulfurreducens* Fuel Cells'. *PLoS ONE* 4 (5). doi:10.1371/journal.pone.0005628.
- Nevin, K. P., H. Richter, S. F. Covalla, J. P. Johnson, T. L. Woodard, A. L. Orloff, H. Jia, M. Zhang, and D. R. Lovley. 2008. 'Power Output and Columbic Efficiencies from Biofilms of *Geobacter sulfurreducens* Comparable to Mixed Community Microbial Fuel Cells'. *Environmental Microbiology* 10 (10). Blackwell Publishing Ltd: 2505–14. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01675.x.
- Nevin, K. P., T. L. Woodard, A. E. Franks, Z. M. Summers, and D. R. Lovley. 2010. 'Microbial Electrosynthesis: Feeding Microbes Electricity To Convert Carbon Dioxide and Water to Multicarbon Extracellular Organic Compounds'. *mBio* 1 (2). 1752 N St., N.W., Washington, DC: American Society of Microbiology: e00103-10. doi:10.1128/mBio.00103-10.
- Nikaido, H. 1996. 'Multidrug Efflux Pumps of Gram-Negative Bacteria.' *Journal of Bacteriology* 178 (20): 5853–59. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC178438/pdf/1785853.pdf>.
- Nishimura, Y., I. Tan, Y. Ohgami, K. Kohgami, and T. Kamihara. 1983. 'Induction of Membrane-Bound L-Lactate Dehydrogenase in *Escherichia coli* under Conditions of Nitrate Respiration, Fumarate Reduction and Trimethylamine-N-Oxide Reduction (A)'. *FEMS Microbiology Letters* 17: 283–86. doi:10.1111/j.1574-6968.1983.tb00419.x.
- Nishiyama, T., A. Ueki, N. Kaku, K. Watanabe, and K. Ueki. 2009. '*Bacteroides graminisolvens* Sp. Nov., a Xylanolytic Anaerobe Isolated from a Methanogenic Reactor Treating Cattle Waste'. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* 59 (8). Microbiology Society: 1901–7. doi:10.1099/ijs.0.008268-0.
- O'Toole, G. A., and R. Kolter. 1998. 'Flagellar and Twitching Motility Are Necessary for *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development'. *Molecular Microbiology* 30 (2): 295–304. doi:10.1046/j.1365-2958.1998.01062.x.
- Okamoto, A., K. Hashimoto, K. H. Nealson, and R. Nakamura. 2013. 'Rate Enhancement of Bacterial Extracellular Electron Transport Involves Bound Flavin Semiquinones'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (19). National Academy of Sciences: 7856–61. doi:10.1073/pnas.1220823110.
- Parameswaran, P., T. Bry, S. C. Papat, B. G. Lusk, B. E. Rittmann, and C. I. Torres. 2013. 'Kinetic, Electrochemical, and Microscopic Characterization of the Thermophilic, Anode-Respiring Bacterium *Thermincola ferriacetica*'. *Environmental Science & Technology* 47 (9). American Chemical Society: 4934–40. doi:10.1021/es400321c.
- Parameswaran, P., H. Zhang, C. I. Torres, B. E. Rittmann, and R. Krajmalnik-Brown. 2010. 'Microbial Community Structure in a Biofilm Anode Fed with a Fermentable Substrate: The Significance of Hydrogen Scavengers'.

- Biotechnology and Bioengineering* 105 (1). Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company: 69–78. doi:10.1002/bit.22508.
- Park, D. H., and J. G. Zeikus. 2003. 'Improved Fuel Cell and Electrode Designs for Producing Electricity from Microbial Degradation'. *Biotechnology and Bioengineering* 81 (3). Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company: 348–55. doi:10.1002/bit.10501.
- Park, H. S., B. H. Kim, H. S. Kim, H. J. Kim, G. Kim, M. Kim, I. S. Chang, Y. K. Park, and H. I. Chang. 2001. 'A Novel Electrochemically Active and Fe(III) - Reducing Bacterium Phylogenetically Related to *Clostridium butyricum* Isolated from a Microbial Fuel Cell'. *Anaerobe* 7 (6): 297–306. doi:10.1006/anae.2001.0399.
- Patil, S. A., F. Harnisch, C. Koch, T. Hübschmann, I. Fetzer, A. A. Carmona-Martínez, S. Müller, and U. Schröder. 2011. 'Electroactive Mixed Culture Derived Biofilms in Microbial Bioelectrochemical Systems: The Role of pH on Biofilm Formation, Performance and Composition'. *Bioresource Technology* 102 (20): 9683–90. doi:10.1016/j.biortech.2011.07.087.
- Peña-Méndez, M. E., J. Havel, and J. Patočka. 2005. 'Humic Substances – Compounds of Still Unknown Structure : Applications in Agriculture , Industry , Environment , and Biomedicine'. *J. Appl. Biomed.* 3: 13–24. doi:[https://assets.motherearthlabs.com/resources/4.humic\\_.substances.compnds.of\\_.unkwn\\_.structure2005.pdf](https://assets.motherearthlabs.com/resources/4.humic_.substances.compnds.of_.unkwn_.structure2005.pdf).
- Pham, H.T., N. Boon, P. Aelterman, P. Clauwaert, L. De Schampelaire, P. Van Oostveldt, K. Verbeken, K. Rabaey, and W. Verstraete. 2008. 'High Shear Enrichment Improves the Performance of the Anodophilic Microbial Consortium in a Microbial Fuel Cell'. *Microbial Biotechnology* 1 (6): 487–96. doi:10.1111/j.1751-7915.2008.00049.x.
- Pirbadian, S., S. E. Barchinger, K. M. Leung, H. S. Byun, Y. Jangir, R. A. Bouhenni, S. B. Reed, et al. 2014. '*Shewanella oneidensis* MR-1 Nanowires Are Outer Membrane and Periplasmic Extensions of the Extracellular Electron Transport Components'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (35): 12883–88. doi:10.1073/pnas.1410551111.
- Popov, V. O., V. S. Lamzint, and A. N. Bakh. 1994. 'NAD<sup>+</sup>-Dependent Formate Dehydrogenase'. *Biochem. J* 301: 625–43. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1137035/pdf/biochemj00082-0011.pdf>.
- Potter, M. C. 1911. 'Electrical Effects Accompanying the Decomposition of Organic Compounds'. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character* 84 (571): 260 LP-276. <http://rspb.royalsocietypublishing.org/content/84/571/260.abstract>.
- Pratt, L. A., and R. Kolter. 1998. 'Genetic Analysis of *Escherichia coli* Biofilm Formation: Roles of Flagella, Motility, Chemotaxis and Type I Pili'. *Molecular Microbiology* 30 (2). Blackwell Science Ltd, UK: 285–93. doi:10.1046/j.1365-2958.1998.01061.x.

- Rabaey, K., N. Boon, M. Höfte, and W. Verstraete. 2005a. 'Microbial Phenazine Production Enhances Electron Transfer in Biofuel Cells'. *Environmental Science & Technology* 39 (9). American Chemical Society: 3401–8. doi:10.1021/es048563o.
- Rabaey, K., N. Boon, S. D. Siciliano, M. Verhaege, and W. Verstraete. 2004. 'Biofuel Cells Select for Microbial Consortia That Self-Mediate Electron Transfer'. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (9): 5373–82. doi:10.1128/AEM.70.9.5373-5382.2004.
- Rabaey, K., G. Lissens, S. D. Siciliano, and W. Verstraete. 2003. 'A Microbial Fuel Cell Capable of Converting'. *Biotechnol. Lett.* 25: 1531.
- Rabaey, Korneel, Peter Clauwaert, Peter Aelterman, and Willy Verstraete. 2005b. 'Tubular Microbial Fuel Cell for Efficient Electricity Generation'. *Environmental Science and Technology* 39 (20): 8077–82. doi:10.1021/es050986i.
- Rabaey, Korneel, and Willy Verstraete. 2005. 'Microbial Fuel Cells: Novel Biotechnology for Energy Generation'. *Trends in Biotechnology* 23 (6): 291–98. doi:10.1016/j.tibtech.2005.04.008.
- Ragsdale, S. W., and E. Pierce. 2008. 'Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl Pathway of CO<sub>2</sub> Fixation'. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. doi:10.1016/j.bbapap.2008.08.012.
- Reguera, G., K. D. McCarthy, T. Mehta, J. S. Nicoll, M. T. Tuominen, and D. R. Lovley. 2005. 'Extracellular Electron Transfer via Microbial Nanowires'. *Nature* 435 (7045). Macmillan Magazines Ltd.: 1098–1101. <http://dx.doi.org/10.1038/nature03661>.
- Reguera, G., K. P. Nevin, J. S. Nicoll, S. F. Covalla, T. L. Woodard, and D. R. Lovley. 2006. 'Biofilm and Nanowire Production Leads to Increased Current in *Geobacter sulfurreducens* Fuel Cells'. *Appl Environ Microbiol* 72. doi:10.1128/AEM.01444-06.
- Ren, Z., T. E. Ward, and J. M. Regan. 2007. 'Electricity Production from Cellulose in a Microbial Fuel Cell Using a Defined Binary Culture'. *Environmental Science & Technology* 41 (13). American Chemical Society: 4781–86. doi:10.1021/es070577h.
- Reshes, G., S. Vanounou, I. Fishov, and M. Feingold. 2008. 'Cell Shape Dynamics in *Escherichia coli*.' *Biophysical Journal* 94 (1). The Biophysical Society: 251–64. doi:10.1529/biophysj.107.104398.
- Richter, H., M. Lanthier, K. P. Nevin, and D. R. Lovley. 2007. 'Lack of Electricity Production by *Pelobacter carbinolicus* Indicates That the Capacity for Fe(III)-Oxide Reduction Does Not Necessarily Confer Electron Transfer Ability to Fuel Cell Anodes'. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (16). American Society for Microbiology: 5347–53. doi:10.1128/AEM.00804-07.
- Richter, L. V., S. J. Sandler, and R. M. Weis. 2012. 'Two Isoforms of *Geobacter sulfurreducens* PilA Have Distinct Roles in Pilus Biogenesis, Cytochrome Localization, Extracellular Electron Transfer, and Biofilm Formation'. *Journal*

- of Bacteriology* 194 (10): 2551–63. doi:10.1128/JB.06366-11.
- Ridoutt, B. G., and S. Pfister. 2010. 'A Revised Approach to Water Footprinting to Make Transparent the Impacts of Consumption and Production on Global Freshwater Scarcity'. *Global Environmental Change* 20 (1): 113–20. doi:10.1016/j.gloenvcha.2009.08.003.
- Roden, E. E., A. Kappler, I. Bauer, J. Jiang, A. Paul, R. Stoesser, H. Konishi, and H. Xu. 2010. 'Extracellular Electron Transfer through Microbial Reduction of Solid-Phase Humic Substances'. *Nature Geosci* 3 (6). Nature Publishing Group: 417–21. <http://dx.doi.org/10.1038/ngeo870>.
- Roller, C., M. Wagner, R. Amann, and W. Ludwig. 1994. 'In Situ Probing of Gram-Positive Bacteria with High DNA G + C Content Using 23s rRNA- Targeted Oligonucleotides Carsten'. *Microbiology*, no. 1 994: 2849–58.
- Rosenbaum, M., F. Aulenta, M. Villano, and L. T. Angenent. 2011. 'Cathodes as Electron Donors for Microbial Metabolism: Which Extracellular Electron Transfer Mechanisms Are Involved?' *Bioresource Technology*. doi:10.1016/j.biortech.2010.07.008.
- Roser, M., and E. Ortiz-Ospina. 2017. 'World Population Growth'. *OurWorldInData.org*. <https://ourworldindata.org/world-population-growth/>.
- Ross, D. E., S. S. Ruebush, S. L. Brantley, R. S. Hartshorne, T. A. Clarke, D. J. Richardson, and M. Tien. 2007. 'Characterization of Protein-Protein Interactions Involved in Iron Reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1'. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (18): 5797–5808. doi:10.1128/AEM.00146-07.
- Rozendal, R. A., H. V. M. Hamelers, K. Rabaey, J. Keller, and C. J. N. Buisman. 2008. 'Towards Practical Implementation of Bioelectrochemical Wastewater Treatment'. *Trends in Biotechnology*. doi:10.1016/j.tibtech.2008.04.008.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. 'DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74 (12): 5463–67. doi:10.1073/pnas.74.12.5463.
- Santoro, C., C. Arbizzani, B. Erable, and I. Ieropoulos. 2017. 'Microbial Fuel Cells: From Fundamentals to Applications. A Review'. *Journal of Power Sources* 356 (July): 225–44. doi:10.1016/j.jpowsour.2017.03.109.
- Santos, T. C., M. A. Silva, L. Morgado, J. M. Dantas, and C. A. Salgueiro. 2015. 'Diving into the Redox Properties of *Geobacter sulfurreducens* Cytochromes: A Model for Extracellular Electron Transfer'. *Dalton Transactions* 44 (20). The Royal Society of Chemistry: 9335–44. doi:10.1039/C5DT00556F.
- Schauder, R., B. Eikmanns, R. K. Thauer, F. Widdel, and G. Fuchs. 1986. 'Acetate Oxidation to CO<sub>2</sub> in Anaerobic Bacteria via a Novel Pathway Not Involving Reactions of the Citric Acid Cycle'. *Archives of Microbiology* 145 (2): 162–72. doi:10.1007/BF00446775.
- Schleifer, K. H., and R. Kilpper-Balz. 1984. 'Transfer of *Streptococcus faecalis* and

- Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* Nom. Rev. as *Enterococcus faecalis* Comb. Nov. and *Enterococcus faecium* Comb. Nov.' *International Journal of Systematic Bacteriology* 34 (1): 31–34. doi:10.1099/00207713-34-1-31.
- Schröder, U. 2007. 'Anodic Electron Transfer Mechanisms in Microbial Fuel Cells and Their Energy Efficiency.' *Physical Chemistry Chemical Physics : PCCP* 9 (21): 2619–29. doi:10.1039/b703627m.
- Schröder, U., F. Harnisch, and L. T. Angenent. 2015. 'Microbial Electrochemistry and Technology: Terminology and Classification'. *Energy Environ. Sci.* 8 (2): 513–19. doi:10.1039/C4EE03359K.
- Schwalb, C., S. K. Chapman, and G. A. Reid. 2002. 'The Membrane-Bound Tetrahaem c-Type Cytochrome CymA Interacts Directly with the Soluble Fumarate Reductase in *Shewanella*'. *Biochemical Society Transactions* 30 (4): 658–62. <http://www.biochemsoctrans.org/content/30/4/658.abstract>.
- Schwalb, C., S. K. Chapman, and G. A. Reid. 2003. 'The Tetraheme Cytochrome CymA Is Required for Anaerobic Respiration with Dimethyl Sulfoxide and Nitrite in *Shewanella oneidensis*'. *Biochemistry* 42 (31): 9491–97. doi:10.1021/bi034456f.
- Seidel, J., M. Hoffmann, K. E. Ellis, A. Seidel, T. Spatzal, S. Gerhardt, S. J. Elliott, and O. Einsle. 2012. 'MacA Is a Second Cytochrome c Peroxidase of *Geobacter sulfurreducens*'. *Biochemistry* 51 (13). American Chemical Society: 2747–56. doi:10.1021/bi300249u.
- Shi, L., B. Chen, Z. Wang, D. A. Elias, M. U. Mayer, Y. A. Gorby, S. Ni, et al. 2006. 'Isolation of a High-Affinity Functional Protein Complex between OmcA and MtrC: Two Outer Membrane Decaheme c-Type Cytochromes of *Shewanella oneidensis* MR-1'. *Journal of Bacteriology* 188 (13): 4705–14. doi:10.1128/JB.01966-05.
- Shi, L., D. J. Richardson, Z. Wang, S. N. Kerisit, K. M. Rosso, J. M. Zachara, and J. K. Fredrickson. 2009. 'The Roles of Outer Membrane Cytochromes of *Shewanella* and *Geobacter* in Extracellular Electron Transfer'. *Environmental Microbiology Reports* 1 (4): 220–27. doi:10.1111/j.1758-2229.2009.00035.x.
- Simpson, F. B., and R. H. Burris. 1984. 'A Nitrogen Pressure of 50 Atmospheres Does Not Prevent Evolution of Hydrogen by Nitrogenase'. *Science* 224 (4653): 1095 LP-1097. <http://science.sciencemag.org/content/224/4653/1095.abstract>.
- Stookey, L. L. 1970. 'Ferrozine - a New Spectrophotometric Reagent for Iron'. *Analytical Chemistry* 42 (7). American Chemical Society: 779–81. doi:10.1021/ac60289a016.
- Sturm-Richter, K., F. Golitsch, G. Sturm, E. Kipf, A. Dittrich, S. Beblawy, S. Kerzenmacher, and J. Gescher. 2015. 'Unbalanced Fermentation of Glycerol in *Escherichia coli* via Heterologous Production of an Electron Transport Chain and Electrode Interaction in Microbial Electrochemical Cells'. *Bioresource Technology* 186 (June): 89–96.

doi:10.1016/j.biortech.2015.02.116.

- Sturm, G., K. Richter, A. Doetsch, H. Heide, R. O. Louro, and J. Gescher. 2015. 'A Dynamic Periplasmic Electron Transfer Network Enables Respiratory Flexibility beyond a Thermodynamic Regulatory Regime'. *ISME J* 9 (8). International Society for Microbial Ecology: 1802–11. <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2014.264>.
- Sugnaux, M., S. Mermoud, A. F. da Costa, M. Happe, and F. Fischer. 2013. 'Probing Electron Transfer with *Escherichia coli*: A Method to Examine Exoelectronics in Microbial Fuel Cell Type Systems'. *Bioresource Technology* 148 (November): 567–73. doi:10.1016/j.biortech.2013.09.004.
- Tender, L. M., S. A. Gray, E. Groveman, D. A. Lowy, P. Kauffman, J. Melhado, R. C. Tyce, D. Flynn, R. Petrecca, and J. Dobarro. 2008. 'The First Demonstration of a Microbial Fuel Cell as a Viable Power Supply: Powering a Meteorological Buoy'. *Journal of Power Sources* 179 (2): 571–75. doi:10.1016/j.jpowsour.2007.12.123.
- Tender, L. M., C. E. Reimers, H. A. Stecher, D. E. Holmes, D. R. Bond, D. A. Lowy, K. Pilobello, S. J. Fertig, and D. R. Lovley. 2002. 'Harnessing Microbially Generated Power on the Seafloor'. *Nat Biotech* 20 (8). Nature Publishing Group: 821–25. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt716>.
- TerAvest, M. A., and C. M. Ajo-Franklin. 2016. 'Transforming Exoelectrogens for Biotechnology Using Synthetic Biology'. *Biotechnology and Bioengineering* 113 (4): 687–97. doi:10.1002/bit.25723.
- TerAvest, M. A., and L. T. Angenent. 2014. 'Oxidizing Electrode Potentials Decrease Current Production and Coulombic Efficiency through Cytochrome c Inactivation in *Shewanella oneidensis* MR-1'. *ChemElectroChem* 1 (11): 2000–2006. doi:10.1002/celec.201402128.
- Torres, C. I., R. Krajmalnik-Brown, P. Parameswaran, A. K. Marcus, G. Wanger, Y. A. Gorby, and B. E. Rittmann. 2009. 'Selecting Anode-Respiring Bacteria Based on Anode Potential: Phylogenetic, Electrochemical, and Microscopic Characterization'. *Environmental Science & Technology* 43 (24). American Chemical Society: 9519–24. doi:10.1021/es902165y.
- Torres, C. I., A. K. Marcus, and B. E. Rittmann. 2007. 'Kinetics of Consumption of Fermentation Products by Anode-Respiring Bacteria'. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77 (3): 689–97. doi:10.1007/s00253-007-1198-z.
- Torres, C. I., A. K. Marcus, and B. E. Rittmann. 2008. 'Proton Transport inside the Biofilm Limits Electrical Current Generation by Anode-Respiring Bacteria'. *Biotechnology and Bioengineering* 100 (5): 872–81. doi:10.1002/bit.21821.
- Tsapin, A. I., I. Vandenberghe, K. H. Nealson, J. H. Scott, T. E. Meyer, M. A. Cusanovich, E. Harada, et al. 2001. 'Identification of a Small Tetraheme Cytochrome c and a Flavocytochrome c as Two of the Principal Soluble Cytochromes c in *Shewanella oneidensis* Strain MR1'. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (7): 3236–44. doi:10.1128/AEM.67.7.3236-3244.2001.

- Ueki, T., C. Leang, K. Inoue, and D. R. Lovley. 2012. 'Identification of Multicomponent Histidine-Aspartate Phosphorelay System Controlling Flagellar and Motility Gene Expression in *Geobacter* Species'. *Journal of Biological Chemistry* 287 (14). American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 10958–66. doi:10.1074/jbc.M112.345041.
- Umweltbundesamt. 2014. 'Berichterstattung Unter Der Klimarahmenkonvention Der Vereinten Nationen Und Dem Kyoto-Protokoll 2014'. 24/2014. <http://www.umweltbundesamt.de/themen/klima-energie#strap1>.
- Umweltbundesamt. 2017. 'Erneuerbare Energien in Deutschland - Daten Zur Entwicklung Im Jahr 2016'. <http://www.umweltbundesamt.de>.
- UN-WWAP. 2015. 'The United Nations World Water Development Report 2015: Water for a Sustainable World'. doi:978-92-3-100071-3.
- UN-WWAP. 2017. 'The United Nations World Water Development Report 2017: Wastewater The Untapped Resource'. <http://unesdoc.unesco.org/images/0024/002475/247553e.pdf>.
- Velasquez-Orta, S. B., I. M. Head, T. P. Curtis, and K. Scott. 2011. 'Factors Affecting Current Production in Microbial Fuel Cells Using Different Industrial Wastewaters'. *Bioresource Technology* 102 (8): 5105–12. doi:10.1016/j.biortech.2011.01.059.
- Wagner, M., and A. Loy. 2002. 'Bacterial Community Composition and Function in Sewage Treatment Systems'. *Current Opinion in Biotechnology*. doi:10.1016/S0958-1669(02)00315-4.
- Wang, C.-T., W.-J. Chen, and R.-Y. Huang. 2010. 'Influence of Growth Curve Phase on Electricity Performance of Microbial Fuel Cell by *Escherichia coli*'. *International Journal of Hydrogen Energy* 35 (13): 7217–23. doi:10.1016/j.ijhydene.2010.01.038.
- Wang, H., X. Wen, X. Zhang, and C. Liu. 2017. 'Acetylation of Microcrystalline Cellulose by Transesterification in AmimCl/DMSO Cosolvent System'. *Molecules* 22 (9): 1419. doi:10.3390/molecules22091419.
- Watnick, P., and R. Kolter. 2000. 'Biofilm, City of Microbes'. *Journal of Bacteriology*. American Society for Microbiology. doi:10.1128/JB.182.10.2675-2679.2000.
- Weiner, J. H., R. A. Rothery, D. Sambasivarao, and C. A. Trieber. 1992. 'Molecular Analysis of Dimethylsulfoxide Reductase: A Complex Iron-Sulfur Molybdoenzyme of *Escherichia coli*'. *BBA - Bioenergetics*. doi:10.1016/0005-2728(92)90059-B.
- Xie, S., P. Liang, Y. Chen, X. Xia, and X. Huang. 2011. 'Simultaneous Carbon and Nitrogen Removal Using an Oxic/anoxic-Biocathode Microbial Fuel Cells Coupled System'. *Bioresource Technology* 102 (1): 348–54. doi:10.1016/j.biortech.2010.07.046.
- Xu, S., and H. Liu. 2011. 'New Exoelectrogen *Citrobacter* Sp. SX-1 Isolated from a

- Microbial Fuel Cell'. *Journal of Applied Microbiology* 111 (5). Blackwell Publishing Ltd: 1108–15. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05129.x.
- Yong, Y. C., Y. Y. Yu, Y. Yang, J. Liu, J. Y. Wang, and H. Song. 2013. 'Enhancement of Extracellular Electron Transfer and Bioelectricity Output by Synthetic Porin'. *Biotechnology and Bioengineering* 110 (2): 408–16. doi:10.1002/bit.24732.
- Zacharoff, L., C. H. Chan, and D. R. Bond. 2016. 'Reduction of Low Potential Electron Acceptors Requires the CbcL Inner Membrane Cytochrome of *Geobacter sulfurreducens*'. *Bioelectrochemistry* 107: 7–13. doi:10.1016/j.bioelechem.2015.08.003.
- Zhang, J., E. Zhang, K. Scott, and J. G. Burgess. 2012. 'Enhanced Electricity Production by Use of Reconstituted Artificial Consortia of Estuarine Bacteria Grown as Biofilms'. *Environmental Science & Technology* 46 (5). American Chemical Society: 2984–92. doi:10.1021/es2020007.
- Zhang, T., C. Cui, S. Chen, X. Ai, H. Yang, P. Shen, and Z. Peng. 2006. 'A Novel Mediatorless Microbial Fuel Cell Based on Direct Biocatalysis of *Escherichia coli*'. *Chemical Communications*, no. 21: 2257. doi:10.1039/b600876c.
- Zhang, T., C. Cui, S. Chen, H. Yang, and P. Shen. 2008. 'The Direct Electrocatalysis of *Escherichia coli* through Electroactivated Excretion in Microbial Fuel Cell'. *Electrochemistry Communications* 10 (2): 293–97. doi:10.1016/j.elecom.2007.12.009.
- Zhang, X., F. Zhu, L. Chen, Q. Zhao, and G. Tao. 2013. 'Removal of Ammonia Nitrogen from Wastewater Using an Aerobic Cathode Microbial Fuel Cell'. *Bioresour. Technol.* 146 (October): 161–68. doi:10.1016/j.biortech.2013.07.024.
- Zhao, Y., H. Tang, and Y. Ye. 2012. 'RAPSearch2: A Fast and Memory-Efficient Protein Similarity Search Tool for next-Generation Sequencing Data'. *Bioinformatics* 28 (1): 125–26. doi:10.1093/bioinformatics/btr595.
- Zhou, M., M. Chi, J. Luo, H. He, and T. Jin. 2011. 'An Overview of Electrode Materials in Microbial Fuel Cells'. *Journal of Power Sources* 196 (10). Elsevier B.V.: 4427–35. doi:10.1016/j.jpowsour.2011.01.012.
- Zou, Y. J., L. X. Sun, F. Xu, and L. N. Yang. 2007. 'E. Coli Microbial Fuel Cell Using New Methylene Blue as Electron Mediator'. *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao/Chemical Journal of Chinese Universities* 28 (3): 510–13. <http://cas-ir.dicp.ac.cn/handle/321008/140600>.

## Anhang

Tabelle 44: Daten der Metatranskriptomanalyse aus dem Vergleich 6. Adaptationsgeneration mit 1. Adaptationsgeneration, Durchfluss-System mit 6. Adaptationsgeneration und Durchfluss-System mit 1. Adaptationsgeneration. Vergleich mit dem Genom von *G. sulfurreducens*. Lokus ID der Gene mit den log<sub>2</sub> FC (Fold Change)-Daten der Vergleiche.

Lokus ID	log <sub>2</sub> FC 6. AG vs. 1. AG	log <sub>2</sub> FC DF vs. 1. AG	log <sub>2</sub> FC DF vs. 6. AG				
GSU0000.1	-0,780	0,982	1,762	GSU0065	-0,953	0,009	0,962
GSU0001	-0,070	0,488	0,558	GSU0066	-1,241	-0,567	0,674
GSU0002	0,068	-0,918	-0,986	GSU0067	-1,884	-0,363	1,521
GSU0003	0,798	-0,981	-1,779	GSU0068	-1,696	-0,775	0,921
GSU0004	1,196	-1,189	-2,386	GSU0069	-0,806	-0,450	0,356
GSU0005	1,129	-0,994	-2,123	GSU0070	0,788	0,601	-0,186
GSU0006	1,983	-0,355	-2,339	GSU0071	-2,623	-1,882	0,741
GSU0007	1,587	1,030	-0,557	GSU0073	0,667	1,370	0,703
GSU0008	1,980	1,969	-0,012	GSU0074	0,454	1,410	0,956
GSU0009	1,107	1,542	0,435	GSU0075	0,881	0,371	-0,510
GSU0010	2,177	2,373	0,196	GSU0076	-0,276	-0,782	-0,506
GSU0011	1,455	1,339	-0,116	GSU0077	0,163	0,819	0,657
GSU0012	-0,645	2,557	3,202	GSU0078	-0,750	-1,030	-0,280
GSU0013	-1,094	2,789	3,883	GSU0079	-0,204	-0,786	-0,582
GSU0014	-0,889	-0,173	0,716	GSU0080	0,207	0,774	0,567
GSU0015	-0,442	-0,601	-0,159	GSU0081	-0,381	0,589	0,970
GSU0016	-0,299	-0,171	0,128	GSU0082	0,504	-0,216	-0,721
GSU0017	0,140	-0,664	-0,804	GSU0083	0,665	-0,813	-1,477
GSU0018	-0,853	0,167	1,020	GSU0084	-0,208	-0,921	-0,713
GSU0019	-0,109	-1,317	-1,208	GSU0085	1,994	1,303	-0,691
GSU0020	0,275	0,978	0,704	GSU0087	3,058	0,836	-2,222
GSU0021	0,634	1,587	0,953	GSU0088	3,521	0,226	-3,295
GSU0022	-0,379	0,829	1,209	GSU0089	3,061	1,539	-1,522
GSU0023	0,147	-0,705	-0,851	GSU0090	2,383	1,071	-1,312
GSU0024	0,103	-0,079	-0,181	GSU0091	2,213	0,557	-1,656
GSU0025	-0,034	-0,822	-0,788	GSU0092	1,769	1,665	-0,105
GSU0026	0,145	-0,730	-0,875	GSU0093	-0,300	-1,735	-1,435
GSU0027	0,063	-0,985	-1,048	GSU0094	-0,990	-0,298	0,692
GSU0028	-0,198	-0,345	-0,146	GSU0095	0,672	0,350	-0,322
GSU0029	-0,232	0,540	0,771	GSU0096	-0,035	3,004	3,039
GSU0030	-0,860	0,296	1,156	GSU0097	0,822	2,908	2,086
GSU0031	-1,123	-0,816	0,307	GSU0098	-0,099	0,698	0,797
GSU0032	-0,681	-0,911	-0,230	GSU0099	-0,302	0,008	0,310
GSU0033	-0,880	-1,047	-0,167	GSU0101	-0,768	-1,220	-0,451
GSU0034	-0,765	-2,230	-1,465	GSU0102	0,343	-1,506	-1,849
GSU0035	-0,092	-0,729	-0,637	GSU0103	-0,479	-0,715	-0,236
GSU0036	0,543	-0,153	-0,696	GSU0104	0,827	-0,305	-1,131
GSU0037	-0,776	-1,344	-0,568	GSU0105	0,223	0,348	0,126
GSU0038	-0,498	-0,724	-0,226	GSU0106	-0,638	-1,572	-0,934
GSU0040	-0,227	-1,563	-1,335	GSU0107	-0,421	-1,595	-1,175
GSU0041	0,511	-2,061	-2,571	GSU0108	0,224	-1,067	-1,291
GSU0042	0,368	-1,799	-2,166	GSU0109	0,076	-0,845	-0,922
GSU0043	0,757	-1,601	-2,359	GSU0110	0,117	-0,690	-0,806
GSU0044	0,534	0,755	0,220	GSU0111	0,212	-1,446	-1,658
GSU0045	0,072	0,984	0,912	GSU0112	0,176	-1,943	-2,119
GSU0046	-0,321	0,122	0,444	GSU0113	0,562	-1,412	-1,973
GSU0047	NA	NA	NA	GSU0114	0,479	-1,801	-2,280
GSU0048	-0,156	0,082	0,237	GSU0115	-0,056	-0,846	-0,790
GSU0049	-1,380	0,735	2,115	GSU0116	0,014	-1,234	-1,248
GSU0050	0,242	-3,532	-3,774	GSU0117	0,089	-0,668	-0,757
GSU0051	-0,024	-2,966	-2,942	GSU0118	1,127	-0,037	-1,163
GSU0052	0,499	-2,720	-3,219	GSU0119	0,684	0,420	-0,264
GSU0053	0,220	-2,245	-2,465	GSU0120	-0,648	0,343	0,991
GSU0054	0,503	-3,005	-3,508	GSU0121	0,183	2,529	2,346
GSU0055	-0,316	1,497	1,813	GSU0122	0,478	2,678	2,200
GSU0056	-1,178	1,196	2,375	GSU0123	-0,756	2,730	3,486
GSU0057	0,742	-1,144	-1,885	GSU0124	0,619	-0,031	-0,649
GSU0058	0,289	-0,495	-0,784	GSU0125	0,938	0,227	-0,710
GSU0060	-0,853	-1,117	-0,264	GSU0126	-1,295	0,560	1,855
GSU0061	-0,594	0,477	1,071	GSU0127	-0,026	1,178	1,204
GSU0062	-0,313	-0,118	0,195	GSU0128	-0,121	-3,424	-3,303
GSU0063	-0,381	-0,732	-0,351	GSU0129	-0,660	-0,923	-0,263
GSU0064	-0,321	0,122	0,444	GSU0130	-0,321	-1,018	-0,696
				GSU0131	-0,279	-0,807	-0,528
				GSU0132	-0,881	-0,600	0,281
				GSU0133	0,089	-2,325	-2,414
				GSU0134	-0,057	0,047	0,104
				GSU0135	0,030	0,311	0,282

GSU0136	-0,322	-0,722	-0,401
GSU0137	0,098	0,045	-0,053
GSU0138	-0,291	0,062	0,353
GSU0139	-0,357	0,070	0,426
GSU0140	-0,278	-0,955	-0,678
GSU0141	0,079	-0,422	-0,501
GSU0142	0,938	-0,337	-1,276
GSU0143	0,631	-1,150	-1,780
GSU0144	1,904	1,046	-0,858
GSU0145	-0,164	-0,308	-0,144
GSU0146	-0,101	-0,375	-0,274
GSU0147	0,429	-0,987	-1,417
GSU0148	0,521	-0,307	-0,828
GSU0149	0,792	0,639	-0,153
GSU0150	-0,524	-0,411	0,114
GSU0151	0,059	-0,334	-0,392
GSU0152	-0,394	-0,838	-0,444
GSU0153	0,247	-0,729	-0,976
GSU0154	-0,028	-1,003	-0,975
GSU0155	0,377	-0,029	-0,406
GSU0156	0,822	-0,181	-1,002
GSU0157	2,097	0,819	-1,278
GSU0158	0,222	0,386	0,164
GSU0159	1,564	0,294	-1,270
GSU0160	1,088	0,297	-0,791
GSU0162	1,503	0,449	-1,054
GSU0163	-0,488	-0,653	-0,165
GSU0164	0,280	-0,224	-0,504
GSU0165	-0,109	1,043	1,153
GSU0167	0,513	1,121	0,608
GSU0168	-1,077	-0,693	0,384
GSU0169	-1,014	-1,621	-0,607
GSU0170	-1,062	-2,399	-1,337
GSU0171	-1,115	-3,529	-2,415
GSU0172	-0,189	1,311	1,500
GSU0173	-0,296	0,432	0,728
GSU0174	2,043	3,841	1,798
GSU0175	-0,123	0,061	0,184
GSU0176	-0,177	0,307	0,485
GSU0177	-2,607	0,574	3,181
GSU0178	-1,976	-0,543	1,434
GSU0179	-0,565	-2,999	-2,435
GSU0180	-0,568	-3,122	-2,554
GSU0181	-0,895	-1,397	-0,503
GSU0182	-0,261	-1,662	-1,401
GSU0183	-1,376	-1,470	-0,094
GSU0184	-1,174	-0,775	0,399
GSU0185	-0,265	2,113	2,378
GSU0186	-0,015	2,500	2,515
GSU0187	-2,629	-1,391	1,238
GSU0188	-2,613	-0,889	1,724
GSU0189	-0,484	-1,834	-1,350
GSU0191	-0,348	0,342	0,690
GSU0192	-0,373	-0,873	-0,500
GSU0193	-0,559	-0,171	0,388
GSU0194	-0,758	-1,337	-0,579
GSU0195	-0,217	0,461	0,678
GSU0196	-0,546	-1,288	-0,743
GSU0197	-0,182	-1,302	-1,120
GSU0198	-2,224	-0,030	2,194
GSU0200	-0,895	2,212	3,107
GSU0201	0,246	2,069	1,823
GSU0202	0,666	1,816	1,150
GSU0203	1,381	1,463	0,081
GSU0204	-1,281	-2,932	-1,650
GSU0205	-0,509	-2,472	-1,964
GSU0206	-1,846	-1,773	0,073
GSU0207	0,244	-0,206	-0,450
GSU0208	0,166	0,313	0,148
GSU0209	-0,304	0,346	0,650
GSU0210	-0,448	-0,753	-0,306
GSU0211	-0,551	-1,326	-0,775
GSU0212	0,056	-1,776	-1,832
GSU0213	0,352	-2,120	-2,472
GSU0214	0,357	1,406	1,048
GSU0215	-0,380	-1,782	-1,403
GSU0216	-0,737	-2,391	-1,654

GSU0217	-0,490	-0,211	0,279
GSU0218	-0,905	-1,254	-0,349
GSU0219	-0,280	0,339	0,619
GSU0220	1,682	1,391	-0,291
GSU0221	2,398	1,143	-1,256
GSU0222	1,801	0,702	-1,099
GSU0223	0,030	0,933	0,903
GSU0224	-0,506	0,961	1,468
GSU0226	-0,105	-0,909	-0,804
GSU0227	1,173	-1,677	-2,851
GSU0228	0,374	0,007	-0,366
GSU0229	-0,240	0,122	0,362
GSU0230	0,689	0,846	0,157
GSU0231	-0,118	-0,802	-0,683
GSU0233	-0,148	0,082	0,230
GSU0234	-0,299	0,320	0,619
GSU0235	-1,300	-2,138	-0,838
GSU0236	2,103	-0,043	-2,146
GSU0237	1,719	0,189	-1,530
GSU0238	1,287	-0,809	-2,096
GSU0239	0,454	-1,730	-2,184
GSU0240	0,606	-0,815	-1,420
GSU0241	-0,462	-1,127	-0,665
GSU0242	-0,799	-0,483	0,316
GSU0243	0,127	-1,388	-1,515
GSU0244	-0,514	-0,953	-0,439
GSU0245	-0,167	-1,309	-1,142
GSU0246	-0,168	-1,642	-1,475
GSU0247	-0,149	-1,369	-1,220
GSU0248	0,527	-0,338	-0,865
GSU0249	0,716	-0,234	-0,950
GSU0250	-0,545	-0,982	-0,437
GSU0251	0,261	0,590	0,329
GSU0252	-1,133	0,536	1,669
GSU0253	0,144	-0,472	-0,616
GSU0254	-0,093	-0,534	-0,442
GSU0255	-1,246	-0,166	1,080
GSU0256	-0,617	-0,124	0,493
GSU0257	-1,483	0,124	1,607
GSU0258	-1,018	0,107	1,124
GSU0259	-0,874	-0,009	0,864
GSU0260	-0,710	0,004	0,714
GSU0261	-0,202	0,381	0,583
GSU0263	-0,597	-0,415	0,182
GSU0264	0,229	0,366	0,137
GSU0265	0,306	2,055	1,750
GSU0266	-1,416	-0,287	1,129
GSU0267	0,224	1,480	1,256
GSU0268	0,419	1,808	1,389
GSU0269	-1,039	1,061	2,100
GSU0270	0,901	-0,144	-1,045
GSU0271	0,147	0,064	-0,083
GSU0272	-0,333	-1,335	-1,002
GSU0273	-1,756	-0,495	1,261
GSU0274	-0,156	-1,814	-1,658
GSU0275	NA	NA	NA
GSU0276	0,334	-1,127	-1,460
GSU0277	0,998	-0,152	-1,151
GSU0278	0,311	1,796	1,485
GSU0279	-0,834	-0,128	0,706
GSU0280	-0,247	-0,121	0,126
GSU0281	-0,346	-0,118	0,228
GSU0283	-0,149	1,230	1,379
GSU0284	-0,432	1,333	1,765
GSU0285	0,470	-0,874	-1,344
GSU0286	-0,295	-0,374	-0,079
GSU0287	0,580	-0,431	-1,010
GSU0288	-0,131	0,005	0,136
GSU0289	0,017	0,442	0,425
GSU0290	-0,210	0,611	0,821
GSU0291	-0,647	-1,157	-0,510
GSU0292	-0,579	-0,956	-0,377
GSU0293	0,051	-0,409	-0,460
GSU0294	0,009	0,193	0,184
GSU0295	-1,767	0,221	1,987
GSU0296	0,763	0,742	-0,020
GSU0297	-1,143	1,066	2,208

GSU0299	1,970	0,617	-1,353
GSU0301	0,097	-0,136	-0,233
GSU0302	0,255	-0,340	-0,595
GSU0303	0,240	-0,128	-0,368
GSU0304	-0,086	-0,113	-0,028
GSU0305	-0,502	0,892	1,394
GSU0306	0,098	-0,979	-1,077
GSU0307	-0,446	-0,228	0,218
GSU0308	0,108	-2,032	-2,140
GSU0309	0,570	-2,136	-2,706
GSU0310	0,549	-1,403	-1,952
GSU0312	1,070	2,104	1,033
GSU0313	0,753	1,578	0,825
GSU0314	1,128	1,358	0,231
GSU0315	-0,428	2,023	2,451
GSU0316	1,467	2,288	0,821
GSU0317	-1,103	0,725	1,827
GSU0318	-1,050	0,259	1,309
GSU0319	0,969	0,757	-0,212
GSU0320	-0,382	1,750	2,132
GSU0321	1,825	1,576	-0,249
GSU0322	0,602	1,438	0,835
GSU0323	2,155	0,880	-1,275
GSU0324	1,410	-0,763	-2,172
GSU0325	2,837	1,034	-1,803
GSU0326	1,881	1,338	-0,544
GSU0327	1,531	-0,211	-1,742
GSU0328	0,774	-0,028	-0,802
GSU0329	0,016	0,241	0,225
GSU0330	-0,915	-0,410	0,505
GSU0331	-0,458	0,765	1,222
GSU0332	-0,032	0,295	0,328
GSU0333	0,978	-0,739	-1,717
GSU0334	0,658	1,012	0,355
GSU0335	0,119	-0,066	-0,185
GSU0336	0,046	-0,059	-0,105
GSU0337	-0,036	0,899	0,935
GSU0338	2,310	4,078	1,769
GSU0339	2,159	3,928	1,768
GSU0340	2,787	3,911	1,124
GSU0341	2,710	3,825	1,115
GSU0342	3,044	3,669	0,624
GSU0343	3,274	3,822	0,548
GSU0344	3,393	3,757	0,364
GSU0345	3,353	3,903	0,550
GSU0346	3,051	3,856	0,806
GSU0347	3,134	3,871	0,737
GSU0348	3,178	3,981	0,803
GSU0349	3,152	4,260	1,108
GSU0350	3,129	4,274	1,145
GSU0351	3,081	4,328	1,247
GSU0352	0,243	1,974	1,731
GSU0353	-0,752	-0,469	0,284
GSU0354	-0,938	0,181	1,119
GSU0355	0,226	1,161	0,935
GSU0356	1,993	1,657	-0,336
GSU0357	1,151	2,232	1,081
GSU0358	-0,902	0,370	1,273
GSU0359	-0,231	0,183	0,414
GSU0360	-0,272	-0,099	0,173
GSU0361	0,888	0,300	-0,588
GSU0362	0,571	4,462	3,891
GSU0363	0,356	-0,414	-0,770
GSU0364	0,779	0,151	-0,628
GSU0365	0,344	-0,279	-0,623
GSU0366	-0,240	0,956	1,196
GSU0367	-0,284	0,177	0,461
GSU0368	0,618	-0,050	-0,668
GSU0369	2,272	0,179	-2,093
GSU0370	2,315	0,975	-1,340
GSU0371	0,866	0,188	-0,678
GSU0372	-0,181	-0,044	0,137
GSU0373	-0,929	0,005	0,934
GSU0374	-1,075	-0,995	0,081
GSU0375	-0,468	0,009	0,477
GSU0376	0,883	1,157	0,274
GSU0377	0,312	0,263	-0,049

GSU0378	0,417	0,805	0,387
GSU0379	1,675	0,903	-0,772
GSU0380	-0,428	2,023	2,451
GSU0381	3,366	3,176	-0,190
GSU0382	1,481	2,374	0,893
GSU0383	-0,518	-0,191	0,328
GSU0384	1,648	3,313	1,665
GSU0385	-1,116	-0,128	0,988
GSU0386	0,108	0,111	0,003
GSU0387	-0,585	-0,316	0,269
GSU0388	-0,966	-2,660	-1,694
GSU0389	-0,782	-2,624	-1,842
GSU0390	-1,015	-0,781	0,234
GSU0391	-1,254	1,260	2,514
GSU0392	0,987	0,678	-0,310
GSU0393	-0,346	0,714	1,060
GSU0394	0,918	1,646	0,728
GSU0395	1,324	1,934	0,610
GSU0396	0,285	2,000	1,715
GSU0397	2,384	2,371	-0,013
GSU0398	1,478	2,503	1,025
GSU0399	-0,145	0,965	1,110
GSU0400	1,550	1,871	0,321
GSU0401	0,723	0,842	0,119
GSU0402	0,625	0,282	-0,343
GSU0403	-0,140	1,607	1,746
GSU0404	-0,124	0,254	0,378
GSU0405	-0,071	-0,193	-0,121
GSU0406	-2,072	-0,215	1,856
GSU0407	0,777	1,655	0,878
GSU0408	-0,541	1,896	2,437
GSU0409	1,455	1,339	-0,116
GSU0410	0,474	0,208	-0,266
GSU0411	-1,342	1,125	2,467
GSU0412	-0,049	-1,520	-1,470
GSU0413	-1,372	-0,318	1,055
GSU0414	-1,795	1,224	3,019
GSU0415	-1,498	1,157	2,655
GSU0416	-2,373	-1,069	1,304
GSU0417	1,813	0,929	-0,884
GSU0418	-0,417	0,366	0,782
GSU0419	-1,179	0,583	1,762
GSU0420	0,732	2,962	2,229
GSU0421	-0,745	2,620	3,365
GSU0422	0,007	1,659	1,652
GSU0423	0,290	0,774	0,484
GSU0424	-0,206	-0,487	-0,281
GSU0425	0,290	0,774	0,484
GSU0426	0,178	-0,246	-0,423
GSU0427	-0,390	-0,041	0,348
GSU0428	1,306	3,763	2,457
GSU0429	0,965	2,868	1,904
GSU0430	0,625	2,428	1,802
GSU0431	0,298	3,265	2,967
GSU0432	2,035	2,405	0,370
GSU0433	1,482	2,301	0,820
GSU0434	-0,764	-0,381	0,383
GSU0435	2,039	2,137	0,099
GSU0436	-0,509	0,513	1,022
GSU0437	-0,855	-2,589	-1,733
GSU0438	-0,599	-1,987	-1,387
GSU0439	-0,495	-2,661	-2,166
GSU0440	-0,192	-2,201	-2,010
GSU0441	-0,249	-2,273	-2,024
GSU0442	0,106	-2,823	-2,929
GSU0443	0,097	-2,319	-2,415
GSU0444	-0,895	-0,087	0,808
GSU0446	-0,332	-0,488	-0,156
GSU0447	-1,305	-0,281	1,023
GSU0448	-1,200	0,739	1,939
GSU0450	-0,908	0,300	1,207
GSU0451	-0,409	0,625	1,034
GSU0452	-0,533	-0,658	-0,125
GSU0453	0,303	0,069	-0,233
GSU0454	0,321	0,223	-0,098
GSU0455	-1,035	-1,309	-0,274
GSU0456	1,154	0,694	-0,460

GSU0457	0,139	-0,399	-0,537
GSU0458	0,410	-1,261	-1,670
GSU0459	0,394	-0,007	-0,401
GSU0460	-0,837	0,663	1,501
GSU0461	0,818	1,117	0,300
GSU0462	0,751	0,653	-0,098
GSU0463	-0,322	-0,192	0,131
GSU0464	-0,260	-1,486	-1,226
GSU0465	-0,800	0,936	1,736
GSU0466	0,639	1,623	0,984
GSU0467	0,633	-0,123	-0,756
GSU0468	0,286	1,260	0,974
GSU0469	0,255	0,347	0,093
GSU0470	1,259	2,076	0,817
GSU0471	0,335	1,852	1,517
GSU0472	-1,331	0,117	1,448
GSU0473	0,044	0,554	0,510
GSU0474	-1,531	0,068	1,598
GSU0475	-0,894	0,477	1,371
GSU0476	-0,069	-0,705	-0,636
GSU0477	-0,020	-0,923	-0,903
GSU0478	0,681	-0,064	-0,744
GSU0479	0,211	-0,829	-1,040
GSU0480	1,438	0,713	-0,725
GSU0481	1,109	0,549	-0,559
GSU0482	-0,418	0,386	0,803
GSU0483	-0,093	-0,680	-0,587
GSU0484	-0,545	-0,443	0,102
GSU0485	-0,673	-1,345	-0,672
GSU0486	-0,342	-0,524	-0,182
GSU0487	-0,795	0,155	0,950
GSU0488	0,239	1,861	1,621
GSU0489	0,549	1,405	0,856
GSU0490	1,380	4,594	3,214
GSU0491	-0,980	-1,279	-0,299
GSU0492	-0,348	1,224	1,572
GSU0493	-0,902	-1,449	-0,546
GSU0494	-0,378	-1,692	-1,314
GSU0496	-0,536	0,805	1,341
GSU0498	0,862	-0,179	-1,041
GSU0499	-0,873	-1,007	-0,134
GSU0500	-0,793	-0,303	0,489
GSU0501	-0,949	-0,047	0,902
GSU0502	-1,680	-0,853	0,827
GSU0503	-1,005	-0,845	0,161
GSU0504	-1,499	-0,275	1,224
GSU0505	-0,621	-0,556	0,065
GSU0506	-1,940	-0,823	1,117
GSU0507	-0,452	-0,733	-0,281
GSU0508	-0,687	-1,305	-0,619
GSU0509	3,260	3,708	0,448
GSU0510	2,643	3,754	1,111
GSU0511	0,855	0,744	-0,111
GSU0512	0,719	0,263	-0,456
GSU0513	-0,435	0,578	1,013
GSU0514	-1,240	1,093	2,333
GSU0515	0,183	2,757	2,574
GSU0516	1,699	1,397	-0,303
GSU0517	2,258	1,993	-0,265
GSU0518	0,910	1,461	0,551
GSU0519	0,042	0,083	0,041
GSU0520	0,476	0,012	-0,465
GSU0521	-1,142	0,308	1,450
GSU0522	-0,542	-0,303	0,239
GSU0523	0,587	0,224	-0,364
GSU0524	0,150	0,352	0,202
GSU0525	1,813	0,929	-0,884
GSU0526	1,724	2,192	0,468
GSU0527	0,943	1,247	0,304
GSU0528	0,425	-0,537	-0,962
GSU0529	0,128	0,384	0,256
GSU0530	-2,059	0,003	2,062
GSU0531	-0,560	0,443	1,003
GSU0533	-0,113	1,114	1,227
GSU0534	0,379	4,394	4,015
GSU0535	0,622	4,049	3,428
GSU0536	0,513	3,337	2,824

GSU0537	0,325	3,042	2,717
GSU0538	-1,123	0,154	1,277
GSU0539	-0,025	2,238	2,263
GSU0540	0,244	-0,542	-0,786
GSU0541	-0,454	-0,468	-0,015
GSU0542	0,444	0,772	0,328
GSU0543	0,180	0,035	-0,144
GSU0544	0,094	0,128	0,034
GSU0545	-0,750	-0,822	-0,071
GSU0546	1,121	-1,060	-2,181
GSU0547	1,149	0,726	-0,424
GSU0548	-1,630	0,478	2,109
GSU0549	-0,321	0,122	0,444
GSU0551	-0,006	1,374	1,380
GSU0552	0,900	1,637	0,737
GSU0553	0,773	1,141	0,368
GSU0555	-0,853	-1,117	-0,264
GSU0556	-0,190	2,151	2,341
GSU0559	0,120	1,301	1,181
GSU0562	0,599	-0,299	-0,897
GSU0563	0,021	0,432	0,410
GSU0564	0,791	0,181	-0,610
GSU0566	1,115	1,752	0,637
GSU0567	-0,051	-0,747	-0,695
GSU0568	-0,224	0,608	0,832
GSU0569	0,783	0,615	-0,167
GSU0570	-0,828	-0,141	0,688
GSU0571	-0,417	0,366	0,782
GSU0572	-0,704	1,038	1,742
GSU0573	-0,346	0,714	1,060
GSU0574	-1,067	-0,221	0,846
GSU0575	0,254	0,101	-0,153
GSU0576	1,072	0,003	-1,070
GSU0577	-1,305	-0,723	0,582
GSU0578	-0,293	0,055	0,348
GSU0579	0,687	-0,156	-0,843
GSU0580	1,874	2,246	0,373
GSU0581	-0,045	0,563	0,608
GSU0582	-0,594	-1,775	-1,181
GSU0583	1,032	2,126	1,094
GSU0584	-0,692	0,394	1,086
GSU0585	-0,996	0,235	1,231
GSU0586	-0,320	-0,110	0,209
GSU0587	0,009	-0,093	-0,102
GSU0588	-0,299	0,914	1,214
GSU0589	0,065	1,588	1,523
GSU0590	1,307	1,908	0,601
GSU0591	0,714	0,913	0,199
GSU0592	0,964	1,678	0,714
GSU0593	2,970	4,352	1,383
GSU0594	2,210	4,434	2,223
GSU0596	1,595	3,963	2,368
GSU0597	1,016	3,576	2,560
GSU0598	-0,109	0,858	0,968
GSU0599	0,492	1,796	1,304
GSU0601	0,205	-0,062	-0,267
GSU0602	0,902	0,008	-0,895
GSU0603	0,268	2,792	2,524
GSU0604	1,223	2,245	1,022
GSU0605	0,579	2,085	1,506
GSU0606	-0,555	-1,589	-1,034
GSU0607	-0,054	-2,329	-2,275
GSU0608	0,270	-0,572	-0,842
GSU0609	0,047	-0,141	-0,188
GSU0610	0,421	-0,754	-1,175
GSU0611	0,055	-0,882	-0,937
GSU0612	0,654	0,135	-0,519
GSU0613	-0,474	-0,213	0,261
GSU0614	-0,437	-1,196	-0,760
GSU0615	-0,584	-1,113	-0,529
GSU0616	-0,098	-1,594	-1,496
GSU0617	-0,309	-0,294	0,015
GSU0618	0,828	3,154	2,326
GSU0619	0,282	0,330	0,049
GSU0621	-0,494	-1,201	-0,707
GSU0622	0,137	-0,849	-0,986
GSU0623	-1,166	-0,152	1,015

GSU0624	0,036	-1,200	-1,236
GSU0625	-0,840	-0,051	0,789
GSU0626	-0,981	0,111	1,092
GSU0627	-0,250	0,101	0,351
GSU0628	-0,959	0,260	1,219
GSU0629	0,630	0,773	0,144
GSU0630	0,270	0,013	-0,257
GSU0631	-0,052	-0,318	-0,266
GSU0632	-0,582	-0,038	0,544
GSU0633	0,899	-0,517	-1,415
GSU0634	1,896	0,272	-1,624
GSU0636	1,881	1,338	-0,544
GSU0637	0,428	1,592	1,164
GSU0638	-0,892	0,151	1,042
GSU0639	-0,173	0,953	1,126
GSU0640	-0,503	-0,024	0,478
GSU0642	-1,036	-1,171	-0,136
GSU0643	-0,181	-0,365	-0,184
GSU0644	-0,131	-0,302	-0,171
GSU0645	-0,573	-1,067	-0,494
GSU0646	-0,503	-1,975	-1,472
GSU0647	-0,463	-1,374	-0,911
GSU0648	-0,258	-1,889	-1,631
GSU0649	-0,742	-2,336	-1,593
GSU0650	-0,746	-2,109	-1,363
GSU0651	-0,700	0,259	0,959
GSU0652	-0,232	-0,344	-0,112
GSU0653	-1,049	0,437	1,486
GSU0654	-1,681	-0,013	1,668
GSU0655	-1,037	0,990	2,027
GSU0656	-0,479	-1,701	-1,222
GSU0657	-0,287	-1,528	-1,241
GSU0658	-1,018	0,160	1,178
GSU0659	-0,575	-1,123	-0,548
GSU0660	-0,804	-2,330	-1,526
GSU0661	-0,716	-1,876	-1,160
GSU0662	-0,656	-1,704	-1,048
GSU0663	-0,591	-2,322	-1,731
GSU0664	-0,785	-2,379	-1,595
GSU0665	-0,810	-1,264	-0,454
GSU0666	-0,971	-0,616	0,355
GSU0667	-0,788	-1,593	-0,805
GSU0668	-0,367	-1,275	-0,907
GSU0670	0,404	1,907	1,503
GSU0671	-0,134	0,385	0,519
GSU0672	-0,902	0,976	1,878
GSU0673	-0,046	-1,157	-1,112
GSU0674	0,596	1,057	0,461
GSU0675	-0,361	1,970	2,331
GSU0676	-0,185	2,149	2,334
GSU0677	0,190	1,449	1,259
GSU0678	0,037	-0,175	-0,212
GSU0679	-0,920	-1,004	-0,084
GSU0680	0,481	0,252	-0,229
GSU0681	0,712	1,508	0,795
GSU0682	-0,568	1,296	1,864
GSU0683	0,154	2,376	2,222
GSU0684	0,270	0,028	-0,242
GSU0685	0,547	-0,339	-0,886
GSU0686	0,067	-0,797	-0,863
GSU0687	-0,045	-1,140	-1,095
GSU0688	-0,433	0,322	0,756
GSU0689	-0,362	-1,886	-1,523
GSU0690	-0,003	-2,777	-2,774
GSU0691	1,053	0,696	-0,357
GSU0692	-1,737	0,792	2,529
GSU0693	0,312	-1,127	-1,439
GSU0694	0,438	-0,848	-1,286
GSU0695	-0,528	0,218	0,746
GSU0696	0,021	-0,084	-0,104
GSU0697	-1,471	-0,019	1,452
GSU0698	0,245	-0,096	-0,341
GSU0699	1,565	0,364	-1,201
GSU0700	-0,353	-0,715	-0,362
GSU0701	-0,706	-0,945	-0,239
GSU0702	0,832	2,794	1,962
GSU0703	2,039	2,137	0,099

GSU0704	-0,618	1,030	1,648
GSU0705	-0,760	1,554	2,313
GSU0706	-1,194	-0,045	1,148
GSU0707	-2,147	-0,472	1,675
GSU0708	0,187	0,357	0,170
GSU0709	-0,239	3,700	3,939
GSU0710	-0,001	1,398	1,399
GSU0711	0,920	4,504	3,584
GSU0712	0,019	1,202	1,184
GSU0713	1,783	4,276	2,492
GSU0714	2,182	4,024	1,842
GSU0715	1,205	3,326	2,120
GSU0716	1,287	3,158	1,871
GSU0717	-0,576	0,140	0,716
GSU0718	-0,145	0,032	0,177
GSU0719	-0,055	-0,649	-0,594
GSU0720	-0,139	-0,080	0,059
GSU0721	-0,059	1,326	1,385
GSU0722	-0,008	2,096	2,104
GSU0723	-0,376	1,475	1,850
GSU0724	0,022	-2,403	-2,425
GSU0725	0,605	-0,068	-0,673
GSU0726	-0,546	-0,661	-0,116
GSU0727	-0,841	-0,036	0,805
GSU0728	0,390	0,199	-0,190
GSU0729	-1,460	-0,111	1,349
GSU0731	-0,499	-0,987	-0,488
GSU0732	-0,080	-0,718	-0,638
GSU0733	0,515	-0,258	-0,773
GSU0734	1,264	1,571	0,307
GSU0735	0,511	0,163	-0,348
GSU0736	1,415	0,099	-1,316
GSU0737	0,266	-1,546	-1,812
GSU0739	1,145	1,938	0,793
GSU0740	1,654	2,410	0,756
GSU0741	0,285	2,000	1,715
GSU0742	2,703	2,800	0,097
GSU0743	2,381	2,784	0,403
GSU0745	1,904	3,498	1,594
GSU0746	-2,461	-0,489	1,972
GSU0747	-1,618	0,993	2,611
GSU0748	-0,843	0,481	1,324
GSU0750	0,789	-0,650	-1,439
GSU0751	-1,071	-2,555	-1,484
GSU0752	0,061	-0,719	-0,780
GSU0753	0,030	0,933	0,903
GSU0754	1,623	1,716	0,093
GSU0755	-0,913	-0,605	0,309
GSU0756	-1,402	-0,837	0,566
GSU0757	-0,115	-0,296	-0,181
GSU0758	1,554	0,172	-1,382
GSU0759	0,984	0,053	-0,932
GSU0761	-0,206	-0,487	-0,281
GSU0762	-0,061	0,420	0,481
GSU0763	0,454	1,624	1,170
GSU0766	-1,665	0,105	1,771
GSU0767	-0,652	0,933	1,585
GSU0768	-0,140	-0,157	-0,017
GSU0769	-2,367	-0,012	2,355
GSU0770	-2,581	-0,323	2,258
GSU0771	-0,920	-0,924	-0,004
GSU0772	-2,051	-1,392	0,659
GSU0773	-1,205	-2,136	-0,930
GSU0774	-1,885	-1,300	0,585
GSU0775	2,420	2,214	-0,206
GSU0776	1,643	2,988	1,345
GSU0777	-1,570	-4,156	-2,586
GSU0778	-1,864	-4,006	-2,142
GSU0779	-0,943	-0,638	0,305
GSU0780	-0,414	-0,526	-0,112
GSU0781	0,191	-1,229	-1,419
GSU0782	0,478	2,156	1,677
GSU0783	0,971	2,360	1,388
GSU0784	0,908	2,351	1,442
GSU0785	1,706	2,518	0,813
GSU0786	2,166	2,493	0,327
GSU0787	1,790	3,110	1,320

GSU0788	0,799	1,839	1,040
GSU0789	-2,047	-3,893	-1,846
GSU0790	-1,813	-3,119	-1,305
GSU0791	-0,769	0,196	0,965
GSU0792	-0,457	0,783	1,240
GSU0793	0,747	2,310	1,563
GSU0794	-0,882	1,678	2,560
GSU0795	0,330	0,830	0,500
GSU0796	0,467	-2,617	-3,083
GSU0797	-0,812	-2,028	-1,217
GSU0798	-0,196	-2,051	-1,855
GSU0799	-0,139	-1,357	-1,218
GSU0800	-0,588	-1,216	-0,628
GSU0801	1,334	0,417	-0,918
GSU0802	-2,000	1,044	3,044
GSU0803	-0,239	0,044	0,283
GSU0804	-0,635	-0,483	0,153
GSU0805	-0,656	0,317	0,972
GSU0806	-0,847	-1,270	-0,423
GSU0807	-1,308	-1,769	-0,460
GSU0808	-0,395	-1,347	-0,952
GSU0809	-0,746	-0,397	0,349
GSU0810	-0,012	1,429	1,441
GSU0811	0,001	-1,401	-1,402
GSU0812	-0,658	-0,716	-0,058
GSU0813	2,429	2,955	0,525
GSU0814	1,834	1,725	-0,109
GSU0815	1,637	2,122	0,486
GSU0816	1,239	1,469	0,231
GSU0817	-0,476	1,683	2,159
GSU0818	-0,317	-1,342	-1,025
GSU0819	0,031	0,670	0,639
GSU0820	-0,545	-0,561	-0,016
GSU0821	0,142	-0,667	-0,809
GSU0822	-0,303	0,467	0,770
GSU0823	-0,253	0,568	0,821
GSU0824	-0,037	0,196	0,232
GSU0825	0,139	-0,208	-0,347
GSU0826	-0,811	-3,265	-2,454
GSU0827	-1,057	0,860	1,916
GSU0828	-0,327	2,967	3,294
GSU0829	-0,503	1,938	2,441
GSU0830	-0,753	0,889	1,642
GSU0831	1,829	-0,388	-2,217
GSU0832	-0,061	0,420	0,481
GSU0834	0,290	0,774	0,484
GSU0835	-0,033	1,472	1,505
GSU0836	-0,014	1,280	1,294
GSU0837	-0,007	1,211	1,217
GSU0841	-0,221	2,735	2,955
GSU0842	-0,032	3,654	3,686
GSU0843	0,781	1,733	0,952
GSU0844	0,295	0,961	0,666
GSU0845	0,797	0,808	0,011
GSU0846	0,253	0,045	-0,209
GSU0847	-0,787	0,166	0,953
GSU0848	-0,174	-0,173	0,001
GSU0849	0,154	-0,150	-0,304
GSU0850	-0,265	0,681	0,946
GSU0851	-0,196	1,087	1,283
GSU0852	-1,304	1,127	2,431
GSU0853	0,397	0,827	0,430
GSU0854	0,720	0,891	0,171
GSU0855	-1,178	1,300	2,478
GSU0856	-1,034	1,628	2,662
GSU0857	-1,815	-0,715	1,099
GSU0858	-1,031	0,686	1,717
GSU0859	-0,282	-0,387	-0,105
GSU0860	0,012	-0,660	-0,672
GSU0861	-0,010	-1,662	-1,652
GSU0862	-0,562	-0,023	0,539
GSU0863	-0,635	0,410	1,045
GSU0864	-0,248	-0,118	0,130
GSU0865	-0,662	0,287	0,949
GSU0866	-0,347	1,438	1,785
GSU0867	-0,625	-0,056	0,570
GSU0868	-0,513	-0,649	-0,135

GSU0869	-0,007	3,414	3,421
GSU0870	0,124	2,161	2,037
GSU0871	0,233	1,636	1,403
GSU0872	0,128	-0,674	-0,801
GSU0874	-0,011	-0,051	-0,039
GSU0876	-0,854	-0,848	0,007
GSU0877	-0,103	-1,457	-1,353
GSU0878	-0,864	-0,555	0,309
GSU0879	-0,001	4,053	4,054
GSU0880	1,881	1,520	-0,361
GSU0881	1,510	0,255	-1,255
GSU0882	1,606	-0,165	-1,771
GSU0883	0,627	1,035	0,407
GSU0884	1,345	1,867	0,522
GSU0885	-1,149	-3,554	-2,405
GSU0886	-0,534	-0,582	-0,048
GSU0887	-1,071	-0,095	0,976
GSU0888	-0,387	-0,529	-0,141
GSU0889	0,706	-0,535	-1,241
GSU0890	-0,111	-1,461	-1,350
GSU0891	-0,028	0,305	0,332
GSU0892	0,237	-1,261	-1,498
GSU0893	-0,288	-0,331	-0,044
GSU0894	-0,362	-0,894	-0,532
GSU0895	-0,776	0,424	1,200
GSU0896	-0,710	-0,089	0,622
GSU0897	-0,141	0,407	0,548
GSU0898	0,182	-0,074	-0,256
GSU0899	0,260	-1,625	-1,886
GSU0900	-0,359	0,459	0,817
GSU0902	-1,217	-0,344	0,873
GSU0903	-1,111	-0,848	0,263
GSU0904	-1,919	-1,000	0,919
GSU0905	-1,133	-1,607	-0,474
GSU0906	-0,567	-0,990	-0,423
GSU0907	-0,413	1,006	1,419
GSU0908	2,006	1,145	-0,861
GSU0909	0,191	0,874	0,683
GSU0910	1,324	1,087	-0,237
GSU0911	0,768	0,919	0,151
GSU0912	0,227	-1,197	-1,424
GSU0913	-0,224	-1,214	-0,990
GSU0914	-1,398	-2,680	-1,283
GSU0915	-0,967	2,261	3,228
GSU0916	-0,125	0,206	0,331
GSU0917	-0,195	0,898	1,093
GSU0918	0,467	0,485	0,017
GSU0919	2,110	4,053	1,943
GSU0921	-0,774	-0,200	0,574
GSU0922	-0,364	-0,566	-0,202
GSU0923	-0,280	-1,038	-0,758
GSU0924	0,099	-0,979	-1,078
GSU0925	-0,118	-1,388	-1,269
GSU0926	0,341	-0,481	-0,822
GSU0927	1,418	0,536	-0,882
GSU0928	1,737	1,474	-0,263
GSU0929	2,408	2,147	-0,262
GSU0930	0,696	1,300	0,604
GSU0931	-1,613	-0,561	1,052
GSU0932	-0,351	0,210	0,561
GSU0933	-0,588	0,423	1,011
GSU0934	-0,481	0,305	0,786
GSU0935	-0,464	1,321	1,785
GSU0936	-2,262	0,105	2,367
GSU0937	1,350	0,091	-1,259
GSU0938	2,643	0,252	-2,392
GSU0939	3,031	-0,689	-3,719
GSU0940	2,895	-0,178	-3,073
GSU0941	1,477	1,680	0,203
GSU0942	-1,324	-0,454	0,870
GSU0943	-0,033	-1,613	-1,579
GSU0944	0,127	3,297	3,170
GSU0945	0,359	2,996	2,637
GSU0946	0,870	1,736	0,867
GSU0947	0,029	-2,111	-2,139
GSU0948	-0,151	-0,596	-0,445
GSU0949	-1,311	-0,244	1,067

GSU0950	-0,614	-0,598	0,016
GSU0951	-1,099	-0,125	0,974
GSU0952	-0,982	0,324	1,306
GSU0953	1,204	0,463	-0,741
GSU0954	0,550	1,466	0,916
GSU0955	-0,206	-0,487	-0,281
GSU0956	-0,088	1,552	1,639
GSU0957	0,428	1,592	1,164
GSU0958	0,215	1,264	1,048
GSU0959	-0,021	0,740	0,762
GSU0961	-0,034	1,470	1,504
GSU0962	2,480	3,733	1,253
GSU0963	1,402	2,460	1,058
GSU0964	-0,004	1,236	1,240
GSU0966	-0,016	1,451	1,467
GSU0967	-0,373	4,087	4,460
GSU0968	-0,114	-0,313	-0,199
GSU0969	-0,517	-0,048	0,468
GSU0970	-0,336	-1,401	-1,065
GSU0971	-0,397	0,218	0,615
GSU0972	1,170	1,643	0,473
GSU0973	1,548	2,483	0,935
GSU0974	2,575	3,469	0,894
GSU0975	3,054	4,178	1,124
GSU0976	2,390	4,029	1,639
GSU0977	2,397	3,750	1,353
GSU0978	2,251	2,985	0,734
GSU0979	1,413	3,796	2,383
GSU0980	2,734	4,023	1,289
GSU0981	1,921	4,466	2,546
GSU0982	2,917	4,112	1,195
GSU0983	2,218	4,009	1,792
GSU0985	1,708	2,739	1,030
GSU0986	0,715	3,654	2,939
GSU0987	2,933	4,067	1,134
GSU0988	2,426	4,143	1,717
GSU0989	2,431	3,771	1,340
GSU0990	2,084	4,127	2,043
GSU0991	0,542	3,546	3,004
GSU0992	1,438	3,378	1,940
GSU0993	1,122	2,198	1,075
GSU0994	2,100	3,996	1,896
GSU0996	-0,385	0,125	0,510
GSU0997	-0,555	-1,880	-1,325
GSU0998	-1,032	-0,244	0,788
GSU0999	0,332	0,154	-0,178
GSU1000	0,123	-1,078	-1,201
GSU1001	0,114	-1,667	-1,781
GSU1002	0,483	-0,751	-1,235
GSU1003	-0,213	-0,838	-0,625
GSU1004	-1,064	-0,735	0,329
GSU1005	-1,235	-1,590	-0,355
GSU1006	0,459	0,845	0,386
GSU1007	0,083	1,953	1,870
GSU1008	-0,826	-0,932	-0,106
GSU1009	-0,103	-0,796	-0,692
GSU1010	-0,662	0,731	1,393
GSU1011	-0,471	0,682	1,154
GSU1012	-1,473	-0,504	0,969
GSU1013	-0,352	-0,073	0,278
GSU1014	-0,519	-1,448	-0,929
GSU1015	0,258	-1,162	-1,420
GSU1016	1,017	0,441	-0,576
GSU1017	-1,471	-1,869	-0,398
GSU1018	1,153	3,461	2,308
GSU1019	-1,175	-1,435	-0,260
GSU1021	-1,321	-1,777	-0,456
GSU1023	-0,506	-0,959	-0,453
GSU1024	-0,411	1,009	1,420
GSU1025	-0,024	2,425	2,449
GSU1026	0,396	0,063	-0,333
GSU1027	0,037	0,257	0,219
GSU1028	-0,357	-0,858	-0,501
GSU1029	0,874	-0,749	-1,624
GSU1030	-0,206	-0,487	-0,281
GSU1032	-0,533	-0,746	-0,213
GSU1033	-1,190	-4,128	-2,939

GSU1034	-1,675	-3,516	-1,840
GSU1035	-0,094	-3,460	-3,367
GSU1036	-0,165	1,770	1,935
GSU1037	0,307	3,322	3,015
GSU1038	-0,181	0,088	0,268
GSU1039	0,243	0,628	0,385
GSU1041	-0,934	-1,040	-0,106
GSU1042	1,605	0,221	-1,384
GSU1043	0,089	0,592	0,503
GSU1044	-0,531	-1,315	-0,784
GSU1045	-0,366	-0,693	-0,327
GSU1046	-0,546	-0,982	-0,436
GSU1047	0,270	-0,823	-1,093
GSU1048	-0,425	-0,796	-0,371
GSU1049	1,057	1,136	0,079
GSU1050	0,152	0,553	0,402
GSU1051	0,158	0,700	0,542
GSU1052	0,467	0,455	-0,012
GSU1053	0,406	1,053	0,647
GSU1054	-1,091	0,776	1,867
GSU1055	-1,403	-0,664	0,740
GSU1056	0,356	0,976	0,620
GSU1057	-0,285	0,626	0,911
GSU1058	1,177	1,620	0,443
GSU1059	1,988	1,737	-0,251
GSU1060	-1,774	-3,618	-1,844
GSU1061	-0,504	-0,630	-0,126
GSU1062	0,180	0,021	-0,159
GSU1063	-1,093	0,464	1,557
GSU1064	-0,370	-0,176	0,194
GSU1065	0,766	0,834	0,069
GSU1066	-0,467	0,833	1,300
GSU1067	-0,563	2,622	3,185
GSU1068	-0,001	1,353	1,354
GSU1069	0,002	1,278	1,276
GSU1070	0,366	4,556	4,190
GSU1071	0,364	4,659	4,294
GSU1072	-0,053	4,502	4,555
GSU1073	-1,782	0,712	2,494
GSU1074	-1,028	-0,683	0,345
GSU1075	-1,093	-0,822	0,271
GSU1076	-0,951	-0,288	0,663
GSU1077	-0,514	-1,290	-0,776
GSU1078	-2,429	-1,597	0,831
GSU1079	0,777	2,232	1,455
GSU1080	-0,547	1,408	1,955
GSU1081	-0,949	-0,446	0,503
GSU1082	-1,336	-0,046	1,289
GSU1083	-0,135	-0,347	-0,212
GSU1084	0,300	-1,271	-1,571
GSU1085	0,841	-0,317	-1,159
GSU1086	1,199	-0,995	-2,194
GSU1087	-0,410	0,579	0,988
GSU1088	0,297	-0,196	-0,494
GSU1089	-1,012	0,503	1,515
GSU1090	-0,656	-0,313	0,343
GSU1091	-0,033	-1,005	-0,972
GSU1092	-0,200	2,715	2,914
GSU1093	-0,153	3,496	3,649
GSU1094	0,503	4,060	3,557
GSU1095	0,019	1,202	1,184
GSU1096	-0,008	1,599	1,607
GSU1097	-0,001	1,422	1,423
GSU1098	0,000	1,222	1,222
GSU1099	0,002	1,765	1,763
GSU1100	0,029	1,190	1,161
GSU1101	-0,387	3,323	3,710
GSU1102	0,060	3,954	3,894
GSU1103	1,138	2,074	0,935
GSU1104	-0,666	-0,298	0,368
GSU1105	1,428	1,843	0,415
GSU1106	1,631	4,575	2,944
GSU1107	-0,543	1,123	1,666
GSU1108	1,286	3,012	1,726
GSU1110	-1,265	-1,744	-0,479
GSU1111	-1,424	-1,844	-0,420
GSU1112	-1,099	-2,811	-1,711

GSU1113	-0,893	-2,789	-1,895
GSU1114	-0,828	1,126	1,954
GSU1115	-0,355	-0,050	0,305
GSU1116	0,334	0,795	0,460
GSU1117	-0,510	0,323	0,832
GSU1118	-0,434	-0,064	0,370
GSU1119	-0,783	-0,382	0,401
GSU1120	-0,406	0,110	0,516
GSU1121	-0,903	-0,175	0,728
GSU1122	-0,320	0,174	0,494
GSU1123	0,724	0,172	-0,551
GSU1124	0,797	1,059	0,262
GSU1125	-0,527	1,605	2,132
GSU1126	1,458	0,177	-1,281
GSU1127	2,182	2,300	0,118
GSU1128	1,649	2,210	0,561
GSU1129	-0,425	-1,131	-0,706
GSU1130	-0,729	-1,178	-0,449
GSU1131	0,061	-0,794	-0,854
GSU1132	0,149	-0,787	-0,936
GSU1133	-0,041	0,009	0,050
GSU1134	-0,483	0,482	0,965
GSU1135	-1,052	-0,613	0,439
GSU1136	-0,329	0,149	0,478
GSU1137	-0,353	-0,690	-0,338
GSU1138	-0,753	-1,585	-0,832
GSU1139	-0,391	-1,187	-0,796
GSU1140	-0,547	0,068	0,616
GSU1141	-0,154	-0,115	0,039
GSU1142	-0,559	-0,226	0,333
GSU1143	0,275	0,070	-0,205
GSU1144	-0,831	0,778	1,609
GSU1145	-0,466	-0,542	-0,076
GSU1146	0,446	-0,087	-0,533
GSU1147	-0,220	-0,124	0,096
GSU1148	0,658	1,719	1,061
GSU1149	0,466	1,811	1,346
GSU1150	-0,482	0,053	0,535
GSU1151	-0,351	-0,637	-0,287
GSU1152	-1,035	-0,948	0,087
GSU1153	1,718	3,696	1,977
GSU1154	1,384	3,130	1,747
GSU1155	0,184	1,248	1,064
GSU1156	0,045	0,636	0,591
GSU1157	0,973	1,774	0,800
GSU1158	-0,718	0,318	1,036
GSU1159	-0,532	0,688	1,220
GSU1160	-0,820	0,629	1,449
GSU1161	-0,438	-0,664	-0,226
GSU1162	-0,862	-0,459	0,403
GSU1163	-1,045	0,339	1,384
GSU1164	0,386	0,114	-0,272
GSU1165	-0,792	0,035	0,826
GSU1166	-0,825	-0,349	0,477
GSU1167	-0,496	0,188	0,684
GSU1168	-0,393	-1,139	-0,747
GSU1169	-1,581	1,034	2,615
GSU1171	-0,816	-0,837	-0,021
GSU1172	0,065	0,655	0,590
GSU1173	1,432	1,135	-0,297
GSU1174	0,138	-0,989	-1,127
GSU1175	-0,644	-0,260	0,383
GSU1176	1,613	3,977	2,364
GSU1177	1,984	3,649	1,665
GSU1178	2,393	3,435	1,042
GSU1179	-0,184	-0,536	-0,352
GSU1180	0,089	-0,116	-0,205
GSU1181	0,983	1,588	0,605
GSU1182	-0,016	0,734	0,750
GSU1183	0,412	4,525	4,113
GSU1184	0,856	3,970	3,114
GSU1185	-0,915	0,741	1,657
GSU1188	-0,662	0,086	0,748
GSU1189	-0,607	0,478	1,086
GSU1190	-0,840	-0,563	0,278
GSU1192	-0,826	-0,022	0,804
GSU1193	-0,425	-0,276	0,149

GSU1194	-1,176	-2,216	-1,040
GSU1195	1,767	-1,105	-2,871
GSU1196	-1,151	-1,269	-0,119
GSU1197	-0,352	-1,666	-1,314
GSU1198	-1,286	-1,656	-0,370
GSU1199	-1,456	-2,928	-1,471
GSU1200	-0,806	-0,923	-0,117
GSU1201	-0,652	-1,668	-1,016
GSU1202	-1,095	-2,210	-1,115
GSU1203	-1,614	-2,041	-0,426
GSU1204	0,065	-1,848	-1,913
GSU1205	-1,036	-1,148	-0,112
GSU1206	1,589	-1,087	-2,675
GSU1207	1,665	0,627	-1,038
GSU1208	0,257	-1,919	-2,176
GSU1209	0,147	1,218	1,072
GSU1210	1,669	0,380	-1,289
GSU1211	-0,981	-1,268	-0,287
GSU1212	-0,171	1,830	2,001
GSU1213	-0,494	0,303	0,797
GSU1214	-0,917	-1,025	-0,108
GSU1215	-0,536	-1,488	-0,951
GSU1216	0,765	0,012	-0,752
GSU1217	-0,224	0,608	0,832
GSU1218	-1,139	-1,331	-0,192
GSU1219	-0,886	-1,336	-0,450
GSU1220	-1,057	-0,490	0,567
GSU1221	0,643	0,254	-0,389
GSU1222	-1,344	1,114	2,458
GSU1223	-0,981	0,731	1,712
GSU1224	1,238	2,055	0,817
GSU1225	0,789	1,408	0,619
GSU1227	-1,109	0,375	1,484
GSU1228	-0,494	1,015	1,509
GSU1229	0,493	1,428	0,935
GSU1230	1,431	1,418	-0,013
GSU1231	0,755	0,902	0,147
GSU1232	0,305	0,602	0,297
GSU1233	-0,350	1,512	1,862
GSU1234	1,042	0,927	-0,115
GSU1235	0,811	-2,123	-2,934
GSU1236	1,120	-1,078	-2,198
GSU1237	1,286	-0,802	-2,087
GSU1238	0,881	-0,155	-1,037
GSU1239	-0,589	0,417	1,006
GSU1240	-1,141	-1,144	-0,004
GSU1241	0,884	0,482	-0,401
GSU1242	-0,083	0,102	0,185
GSU1243	-0,490	0,195	0,685
GSU1244	-0,484	0,140	0,624
GSU1245	-1,185	0,197	1,382
GSU1246	-0,059	0,069	0,127
GSU1247	-0,781	-2,322	-1,542
GSU1249	-1,035	0,589	1,624
GSU1250	0,274	-0,354	-0,628
GSU1251	0,473	0,704	0,231
GSU1252	1,085	-0,061	-1,146
GSU1253	1,699	1,397	-0,303
GSU1254	-0,575	0,170	0,745
GSU1255	NA	NA	NA
GSU1256	NA	NA	NA
GSU1257	-0,224	0,608	0,832
GSU1258	-0,055	0,938	0,993
GSU1259	-1,891	0,774	2,666
GSU1260	-0,125	1,372	1,498
GSU1261	1,386	0,429	-0,957
GSU1262	-0,224	1,125	1,349
GSU1263	-0,018	0,021	0,039
GSU1264	0,550	1,995	1,445
GSU1265	0,933	2,183	1,249
GSU1266	-1,006	-1,124	-0,118
GSU1267	-0,851	-1,678	-0,826
GSU1268	0,328	3,395	3,067
GSU1269	0,091	4,614	4,523
GSU1270	-1,090	0,393	1,484
GSU1271	-0,521	0,406	0,927
GSU1272	-0,403	-0,256	0,147

GSU1273	-0,544	-1,162	-0,618
GSU1274	-0,183	-2,214	-2,031
GSU1275	-1,400	-1,703	-0,303
GSU1276	-0,584	-0,409	0,174
GSU1277	-1,334	-0,331	1,002
GSU1278	-0,688	-0,874	-0,185
GSU1279	-1,705	-1,306	0,399
GSU1280	-2,318	-2,642	-0,325
GSU1281	-0,345	-1,753	-1,408
GSU1282	-1,605	-2,379	-0,774
GSU1283	-0,234	0,468	0,701
GSU1284	-0,296	0,620	0,917
GSU1285	-0,453	-1,096	-0,643
GSU1286	-0,447	-2,546	-2,099
GSU1287	0,044	-0,299	-0,343
GSU1289	0,510	-0,148	-0,658
GSU1290	1,904	0,914	-0,991
GSU1291	-0,552	0,107	0,659
GSU1292	-0,094	-0,110	-0,016
GSU1293	-0,882	-0,351	0,531
GSU1294	-0,815	-0,573	0,242
GSU1295	0,706	-0,270	-0,976
GSU1296	0,643	0,254	-0,389
GSU1297	0,428	1,592	1,164
GSU1298	-0,480	1,601	2,081
GSU1299	-1,278	-0,029	1,249
GSU1300	-1,759	-0,321	1,439
GSU1301	-0,983	0,712	1,694
GSU1302	-0,716	-0,087	0,628
GSU1303	0,324	-0,186	-0,510
GSU1304	-0,666	-0,298	0,368
GSU1305	-0,901	-0,394	0,507
GSU1306	-1,192	0,878	2,069
GSU1307	-0,389	0,374	0,763
GSU1308	1,263	0,810	-0,453
GSU1309	0,161	0,066	-0,095
GSU1310	1,065	-0,830	-1,895
GSU1311	0,334	-1,191	-1,525
GSU1312	0,621	-1,790	-2,411
GSU1313	-0,467	-0,903	-0,435
GSU1314	-0,031	-0,895	-0,864
GSU1315	-0,076	-1,236	-1,160
GSU1316	-1,097	-1,508	-0,411
GSU1317	-1,071	0,234	1,305
GSU1318	-0,924	-0,160	0,764
GSU1319	-0,859	-0,435	0,423
GSU1320	-0,528	-0,922	-0,395
GSU1321	-0,206	0,257	0,463
GSU1322	-2,136	0,692	2,828
GSU1323	0,138	-0,225	-0,363
GSU1324	0,430	-0,114	-0,544
GSU1326	-0,085	-1,423	-1,338
GSU1327	0,167	-1,345	-1,512
GSU1328	0,994	0,334	-0,660
GSU1329	-1,942	-1,865	0,078
GSU1330	0,013	3,269	3,257
GSU1331	1,139	3,270	2,131
GSU1332	0,783	2,480	1,697
GSU1333	1,690	2,429	0,738
GSU1334	-1,095	-1,254	-0,158
GSU1336	-0,299	2,013	2,312
GSU1337	-0,269	0,486	0,755
GSU1338	-0,055	2,895	2,950
GSU1339	-1,267	2,871	4,138
GSU1340	0,582	2,895	2,313
GSU1341	-0,097	2,260	2,357
GSU1342	-0,547	-0,629	-0,082
GSU1343	-0,749	0,926	1,675
GSU1344	-0,624	2,169	2,793
GSU1345	1,083	4,254	3,171
GSU1346	0,569	4,593	4,024
GSU1347	0,488	4,103	3,614
GSU1348	0,718	3,643	2,925
GSU1349	0,523	3,310	2,787
GSU1350	-1,200	0,457	1,657
GSU1351	-1,246	-0,166	1,080
GSU1352	2,923	0,199	-2,724

GSU1353	-1,705	0,004	1,709
GSU1354	-1,655	0,536	2,191
GSU1355	-0,648	0,869	1,516
GSU1356	-1,056	0,974	2,030
GSU1357	-0,194	0,438	0,633
GSU1358	-1,158	0,396	1,553
GSU1359	2,423	1,393	-1,029
GSU1360	2,140	1,869	-0,271
GSU1361	-1,280	1,554	2,834
GSU1362	-0,123	-1,312	-1,189
GSU1363	-0,443	-1,267	-0,825
GSU1364	0,713	1,203	0,490
GSU1365	-0,732	2,272	3,005
GSU1367	-0,334	1,143	1,477
GSU1368	-1,692	0,494	2,185
GSU1369	1,682	1,391	-0,291
GSU1370	-0,323	-3,876	-3,553
GSU1371	-0,331	-4,055	-3,723
GSU1372	-0,666	-4,185	-3,519
GSU1374	0,580	0,553	-0,028
GSU1375	-1,549	-1,689	-0,140
GSU1376	0,275	-0,859	-1,134
GSU1377	-0,199	-1,159	-0,959
GSU1378	-1,053	-1,575	-0,522
GSU1379	-1,118	0,093	1,210
GSU1380	-0,627	0,487	1,114
GSU1381	-1,065	0,226	1,290
GSU1382	-0,084	0,258	0,341
GSU1383	-0,327	-1,037	-0,710
GSU1384	-0,358	-3,044	-2,687
GSU1385	0,386	-2,718	-3,104
GSU1386	0,571	-2,639	-3,211
GSU1387	0,482	-2,207	-2,689
GSU1388	0,282	-2,233	-2,516
GSU1389	0,733	-1,323	-2,056
GSU1390	-0,081	-1,606	-1,525
GSU1391	1,300	-2,716	-4,016
GSU1392	0,708	-1,753	-2,460
GSU1393	1,276	-0,127	-1,403
GSU1394	0,716	-0,687	-1,403
GSU1395	-0,669	-2,085	-1,416
GSU1396	1,131	0,812	-0,319
GSU1397	1,183	0,945	-0,238
GSU1398	-0,217	0,960	1,177
GSU1399	-0,440	1,446	1,886
GSU1400	-1,205	0,727	1,932
GSU1401	-0,495	-0,177	0,318
GSU1402	0,238	-0,523	-0,761
GSU1403	0,346	-1,234	-1,580
GSU1404	-0,032	0,019	0,051
GSU1406	-0,199	-1,174	-0,974
GSU1408	0,133	-0,525	-0,658
GSU1409	0,796	0,437	-0,359
GSU1410	-0,091	-0,306	-0,215
GSU1411	-0,252	-0,090	0,162
GSU1412	-0,635	0,161	0,795
GSU1414	0,012	0,811	0,798
GSU1415	-0,559	-0,622	-0,063
GSU1416	-0,111	-0,015	0,096
GSU1417	0,472	4,363	3,890
GSU1418	-0,001	1,373	1,374
GSU1419	-0,622	-0,768	-0,145
GSU1420	-0,695	-0,962	-0,267
GSU1421	-0,183	-1,165	-0,982
GSU1422	-0,538	-1,196	-0,659
GSU1423	-0,294	-0,119	0,175
GSU1424	0,030	0,202	0,171
GSU1425	-1,547	-0,060	1,486
GSU1426	-0,550	0,822	1,372
GSU1427	-0,525	0,666	1,191
GSU1429	1,594	1,777	0,183
GSU1430	1,437	1,610	0,173
GSU1431	-0,241	0,154	0,395
GSU1432	-0,804	-0,674	0,131
GSU1433	-0,209	-0,590	-0,381
GSU1434	-0,443	-1,166	-0,723
GSU1435	-0,930	-0,411	0,519

GSU1436	-0,142	0,325	0,467	GSU1513	-0,831	0,778	1,609
GSU1437	0,906	1,159	0,253	GSU1514	-1,249	0,155	1,405
GSU1438	1,084	0,651	-0,433	GSU1515	-1,324	-1,175	0,149
GSU1440	1,645	0,797	-0,848	GSU1516	-0,570	0,701	1,272
GSU1441	2,037	2,281	0,244	GSU1517	-0,022	0,421	0,443
GSU1442	1,803	3,137	1,334	GSU1518	-0,174	-0,388	-0,215
GSU1443	0,411	1,559	1,148	GSU1519	-0,480	-0,812	-0,332
GSU1444	-0,651	1,012	1,663	GSU1520	-0,297	-1,904	-1,608
GSU1445	-0,063	1,786	1,850	GSU1521	-0,942	-0,272	0,670
GSU1446	-0,111	-0,372	-0,262	GSU1522	-1,176	0,204	1,380
GSU1447	-0,602	1,987	2,588	GSU1523	-1,067	-0,299	0,768
GSU1448	0,770	1,849	1,079	GSU1524	-0,827	-0,800	0,027
GSU1449	-0,409	0,033	0,442	GSU1525	-1,136	-0,588	0,548
GSU1450	-0,587	-0,070	0,517	GSU1526	-1,309	-1,052	0,257
GSU1451	-0,070	1,036	1,106	GSU1527	0,111	-0,678	-0,789
GSU1452	-0,493	-0,070	0,424	GSU1528	0,407	0,319	-0,089
GSU1453	0,043	-0,303	-0,346	GSU1529	0,483	-0,933	-1,415
GSU1454	0,036	0,215	0,180	GSU1530	0,014	0,274	0,261
GSU1455	-0,706	-0,945	-0,239	GSU1531	0,025	-0,050	-0,075
GSU1456	0,506	-1,337	-1,843	GSU1532	-0,937	-3,053	-2,116
GSU1457	-0,797	-0,461	0,336	GSU1533	-0,563	-3,504	-2,941
GSU1458	0,482	0,700	0,219	GSU1534	0,341	-3,061	-3,402
GSU1459	-1,223	-0,416	0,807	GSU1535	0,819	-2,487	-3,305
GSU1460	-0,893	-0,591	0,302	GSU1536	-0,816	-1,613	-0,798
GSU1461	-0,824	-0,849	-0,025	GSU1537	-1,479	-1,126	0,353
GSU1462	-0,165	-1,636	-1,471	GSU1538	1,094	4,067	2,973
GSU1463	-1,100	-0,346	0,754	GSU1539	0,518	1,217	0,699
GSU1464	-1,262	-1,690	-0,428	GSU1540	1,435	1,529	0,093
GSU1465	1,639	3,466	1,827	GSU1541	0,536	0,798	0,262
GSU1466	2,055	3,309	1,254	GSU1542	0,278	1,518	1,240
GSU1467	1,919	3,683	1,763	GSU1544	0,598	1,004	0,406
GSU1468	2,180	3,792	1,613	GSU1545	1,111	1,653	0,541
GSU1469	2,407	3,579	1,173	GSU1546	-1,091	0,776	1,867
GSU1470	2,384	3,122	0,738	GSU1547	-0,688	-1,692	-1,005
GSU1471	-0,275	0,555	0,829	GSU1548	-0,195	-0,812	-0,617
GSU1472	0,491	1,067	0,576	GSU1549	-0,052	-0,318	-0,266
GSU1473	0,621	0,884	0,264	GSU1550	-0,604	-0,398	0,207
GSU1474	-0,048	0,086	0,134	GSU1551	-1,140	0,115	1,255
GSU1475	0,509	0,271	-0,238	GSU1552	-0,249	-1,102	-0,853
GSU1476	-1,133	0,536	1,669	GSU1553	-1,426	-0,054	1,372
GSU1477	-0,420	1,107	1,527	GSU1554	-1,417	-0,603	0,813
GSU1478	-0,188	0,223	0,410	GSU1555	-0,082	1,206	1,288
GSU1479	-0,264	0,681	0,945	GSU1556	-1,093	-0,181	0,912
GSU1480	1,268	-0,024	-1,292	GSU1557	-0,887	1,034	1,921
GSU1481	0,061	-0,305	-0,366	GSU1558	0,497	-0,120	-0,617
GSU1482	0,228	0,614	0,385	GSU1560	-0,859	0,845	1,703
GSU1483	-1,794	0,375	2,168	GSU1561	-0,429	-0,609	-0,180
GSU1484	-0,643	-0,268	0,375	GSU1562	0,245	-0,710	-0,955
GSU1485	-0,761	-0,453	0,308	GSU1564	0,044	-0,742	-0,786
GSU1486	-0,838	-0,465	0,373	GSU1565	2,407	0,873	-1,533
GSU1487	-0,138	-0,904	-0,766	GSU1566	1,976	2,371	0,396
GSU1488	-0,209	-1,458	-1,249	GSU1567	-0,226	3,762	3,988
GSU1489	0,540	-0,282	-0,821	GSU1568	0,054	3,761	3,707
GSU1490	0,228	0,818	0,591	GSU1569	-0,377	3,563	3,940
GSU1491	-0,011	1,663	1,674	GSU1570	-0,213	3,626	3,839
GSU1492	0,693	2,192	1,500	GSU1571	0,216	1,993	1,777
GSU1493	2,195	2,979	0,783	GSU1572	0,135	1,693	1,558
GSU1494	0,962	2,911	1,949	GSU1573	0,037	0,821	0,784
GSU1495	-0,604	1,534	2,138	GSU1574	-0,831	0,778	1,609
GSU1496	0,299	1,139	0,839	GSU1575	0,625	1,487	0,862
GSU1497	-0,139	0,833	0,972	GSU1576	1,506	0,944	-0,562
GSU1498	-0,305	0,593	0,898	GSU1577	0,409	2,431	2,022
GSU1499	0,482	1,987	1,506	GSU1578	0,443	2,247	1,804
GSU1500	1,371	0,892	-0,480	GSU1579	0,188	1,514	1,326
GSU1501	1,109	1,257	0,147	GSU1580	-1,735	-0,516	1,219
GSU1502	0,126	1,875	1,749	GSU1581	-1,102	-0,634	0,467
GSU1503	0,207	1,124	0,917	GSU1582	-1,818	-2,143	-0,324
GSU1504	-0,783	1,045	1,828	GSU1583	-0,881	-1,715	-0,833
GSU1505	0,065	0,652	0,587	GSU1584	-2,529	-0,902	1,627
GSU1506	-1,104	1,263	2,367	GSU1585	-1,523	-0,989	0,534
GSU1507	1,234	1,476	0,242	GSU1586	-1,529	-0,957	0,571
GSU1508	0,493	2,477	1,984	GSU1587	-1,398	-1,466	-0,068
GSU1509	-1,745	2,155	3,900	GSU1588	-0,912	-2,527	-1,615
GSU1510	-0,266	1,562	1,828	GSU1589	-1,087	-3,053	-1,966
GSU1510.1	0,360	0,726	0,366	GSU1590	-0,951	-2,686	-1,734
GSU1511	-0,086	0,277	0,363	GSU1591	-0,359	-1,993	-1,635
GSU1512	-0,330	0,028	0,358	GSU1592	-0,589	0,232	0,821

GSU1593	-1,040	-0,890	0,150
GSU1594	-0,596	-0,940	-0,344
GSU1595	-1,123	-0,395	0,728
GSU1596	-0,149	0,050	0,199
GSU1597	-0,607	-0,355	0,251
GSU1598	-1,398	-0,640	0,758
GSU1599	-0,980	-0,275	0,705
GSU1600	-1,156	-0,757	0,400
GSU1601	-1,278	-0,676	0,601
GSU1602	-0,770	-1,742	-0,971
GSU1603	-0,542	-1,320	-0,777
GSU1604	0,066	-1,180	-1,246
GSU1605	-0,226	-0,852	-0,625
GSU1606	-0,490	-1,123	-0,633
GSU1607	-0,427	-1,885	-1,458
GSU1608	-0,541	-0,774	-0,233
GSU1609	-0,307	0,437	0,744
GSU1610	-1,198	-0,567	0,631
GSU1611	0,791	0,017	-0,774
GSU1612	-1,620	-0,286	1,334
GSU1613	-0,995	0,202	1,197
GSU1614	-2,111	0,786	2,897
GSU1615	-1,108	0,983	2,091
GSU1616	-0,275	-1,883	-1,608
GSU1617	-0,957	-1,995	-1,038
GSU1618	0,337	0,937	0,599
GSU1619	1,792	-0,362	-2,154
GSU1620	1,621	2,358	0,737
GSU1621	1,551	2,271	0,720
GSU1622	2,887	2,559	-0,328
GSU1623	1,353	1,376	0,023
GSU1624	1,998	1,395	-0,603
GSU1626	-0,194	0,689	0,883
GSU1627	-0,931	-0,406	0,525
GSU1629	0,233	1,581	1,348
GSU1630	-0,591	1,346	1,937
GSU1631	-0,567	-0,515	0,052
GSU1632	-0,501	-0,481	0,020
GSU1633	-0,076	-1,347	-1,271
GSU1634	-0,085	-1,536	-1,452
GSU1635	0,520	-0,651	-1,171
GSU1636	1,019	0,338	-0,680
GSU1637	1,922	1,028	-0,894
GSU1638	0,887	-0,528	-1,415
GSU1639	-0,862	0,103	0,965
GSU1640	-0,681	0,839	1,521
GSU1641	-0,724	0,272	0,996
GSU1642	-0,310	0,638	0,948
GSU1643	-2,757	-0,500	2,257
GSU1644	-0,909	-1,254	-0,345
GSU1646	-0,755	2,383	3,137
GSU1647	1,306	4,550	3,244
GSU1648	1,632	1,534	-0,098
GSU1649	-0,147	0,176	0,323
GSU1650	-0,910	-0,881	0,030
GSU1651	0,002	1,005	1,002
GSU1652	0,068	1,506	1,438
GSU1653	0,425	0,347	-0,077
GSU1654	0,320	1,296	0,977
GSU1655	0,125	1,574	1,449
GSU1656	-0,018	0,990	1,007
GSU1657	-0,879	1,426	2,305
GSU1658	-1,032	0,135	1,167
GSU1659	-0,596	-0,130	0,466
GSU1660	1,573	3,252	1,679
GSU1661	-1,138	1,524	2,663
GSU1662	0,083	1,143	1,060
GSU1663	-1,682	-0,228	1,454
GSU1664	-0,687	0,320	1,007
GSU1665	-1,331	0,949	2,280
GSU1666	0,442	1,368	0,927
GSU1667	-1,625	0,153	1,778
GSU1668	0,841	2,714	1,873
GSU1669	0,326	2,835	2,509
GSU1670	-0,695	2,821	3,516
GSU1671	-1,878	0,017	1,895
GSU1672	-0,353	1,370	1,724

GSU1673	-1,277	0,002	1,279
GSU1674	-1,616	1,094	2,709
GSU1676	0,329	2,620	2,290
GSU1677	-0,519	0,151	0,670
GSU1678	0,317	0,053	-0,264
GSU1679	0,380	1,596	1,216
GSU1680	0,493	3,071	2,578
GSU1681	0,950	3,094	2,144
GSU1682	0,893	1,373	0,480
GSU1683	-0,235	0,967	1,202
GSU1684	-1,175	0,140	1,315
GSU1685	-1,415	0,755	2,170
GSU1686	-1,486	-0,206	1,280
GSU1687	-1,894	0,063	1,957
GSU1688	-0,554	-0,613	-0,060
GSU1689	-0,717	-0,864	-0,147
GSU1690	-0,561	-0,885	-0,324
GSU1691	-0,302	-1,450	-1,148
GSU1692	0,153	-0,679	-0,832
GSU1693	0,253	-0,468	-0,721
GSU1694	-0,016	0,348	0,364
GSU1695	-0,510	0,832	1,343
GSU1696	0,027	0,329	0,301
GSU1697	0,330	-0,005	-0,335
GSU1698	-1,071	-0,226	0,846
GSU1699	-1,754	1,318	3,071
GSU1700	0,510	1,798	1,288
GSU1701	-0,344	1,557	1,901
GSU1702	-0,420	1,094	1,515
GSU1703	0,071	1,170	1,099
GSU1704	-0,115	0,710	0,825
GSU1705	-1,129	0,741	1,870
GSU1706	-0,948	0,516	1,465
GSU1707	-0,461	0,227	0,688
GSU1708	0,228	0,634	0,406
GSU1709	-0,584	2,093	2,677
GSU1710	-0,094	1,027	1,121
GSU1711	-0,023	4,476	4,499
GSU1712	-1,235	0,907	2,142
GSU1713	-0,406	-0,645	-0,238
GSU1715	1,455	2,915	1,459
GSU1716	-0,011	1,368	1,379
GSU1717	0,152	4,376	4,223
GSU1718	0,387	4,266	3,878
GSU1719	-0,844	0,050	0,894
GSU1720	-0,487	1,309	1,796
GSU1721	-1,224	0,582	1,806
GSU1722	-0,872	0,830	1,702
GSU1723	-0,049	0,575	0,624
GSU1724	-0,389	0,411	0,800
GSU1725	0,563	-0,044	-0,608
GSU1726	0,073	1,864	1,790
GSU1727	-0,170	1,273	1,443
GSU1728	-1,296	1,002	2,298
GSU1729	-0,440	0,044	0,484
GSU1730	-0,564	-0,311	0,253
GSU1731	1,369	0,550	-0,819
GSU1732	0,825	1,245	0,419
GSU1733	1,812	2,265	0,453
GSU1734	1,937	2,356	0,419
GSU1735	2,146	2,591	0,445
GSU1736	1,864	3,194	1,330
GSU1737	1,188	2,317	1,129
GSU1738	0,493	2,465	1,972
GSU1739	0,558	2,552	1,994
GSU1740	-1,432	0,184	1,616
GSU1741	0,017	0,442	0,425
GSU1742	0,111	0,833	0,723
GSU1743	0,027	1,016	0,988
GSU1744	-1,668	0,464	2,132
GSU1745	-0,068	0,280	0,349
GSU1746	-0,248	-0,071	0,176
GSU1748	-1,139	-0,908	0,231
GSU1749	0,202	0,576	0,374
GSU1750	-0,492	0,431	0,923
GSU1752	-1,098	-0,259	0,840
GSU1753	-1,643	-1,180	0,463

GSU1754	0,012	-1,882	-1,894
GSU1755	-0,227	-0,209	0,018
GSU1756	-0,303	0,486	0,789
GSU1757	-0,482	0,403	0,885
GSU1758	-0,943	-0,192	0,751
GSU1759	-0,035	-0,017	0,018
GSU1760	-0,670	0,531	1,201
GSU1761	-1,828	-2,670	-0,842
GSU1762	-0,286	-1,637	-1,351
GSU1763	-0,632	-0,909	-0,277
GSU1764	-0,649	-1,412	-0,763
GSU1765	-1,290	-0,569	0,721
GSU1766	-0,142	-0,476	-0,334
GSU1767	-0,461	0,238	0,698
GSU1768	0,263	1,495	1,232
GSU1769	-0,349	0,599	0,948
GSU1770	-0,301	1,121	1,422
GSU1771	-0,237	1,735	1,972
GSU1772	-0,275	1,286	1,562
GSU1773	-0,485	1,402	1,886
GSU1774	0,198	0,263	0,065
GSU1775	0,113	0,169	0,055
GSU1776	0,275	0,498	0,223
GSU1777	1,484	1,554	0,070
GSU1778	1,200	0,597	-0,603
GSU1779	0,402	0,663	0,260
GSU1780	0,061	-0,212	-0,274
GSU1781	0,577	0,470	-0,108
GSU1782	0,825	0,010	-0,814
GSU1783	0,046	0,285	0,239
GSU1784	0,028	0,542	0,514
GSU1785	-1,008	-1,116	-0,109
GSU1786	-0,559	-1,590	-1,031
GSU1787	-0,219	-0,463	-0,244
GSU1788	-0,789	-1,840	-1,051
GSU1789	-1,300	-0,886	0,414
GSU1790	-0,588	-1,401	-0,813
GSU1791	-0,734	0,662	1,395
GSU1792	-0,728	-1,080	-0,352
GSU1793	-1,083	-0,751	0,332
GSU1794	-1,251	-0,953	0,298
GSU1795	-1,454	-0,773	0,680
GSU1796	-1,183	0,412	1,596
GSU1797	-0,900	-0,850	0,050
GSU1798	0,070	1,668	1,598
GSU1799	-0,343	1,981	2,324
GSU1800	0,162	0,061	-0,101
GSU1801	0,411	-0,421	-0,832
GSU1802	0,089	-1,187	-1,276
GSU1803	0,484	-1,310	-1,794
GSU1804	0,358	-0,117	-0,475
GSU1805	-0,083	0,209	0,291
GSU1806	-0,267	0,211	0,478
GSU1807	-0,678	-1,365	-0,687
GSU1808	-1,033	-2,515	-1,482
GSU1809	-0,642	-0,732	-0,090
GSU1810	-1,692	-1,715	-0,023
GSU1811	0,523	-1,122	-1,645
GSU1812	-0,340	-1,236	-0,896
GSU1813	-1,478	-0,117	1,362
GSU1814	0,024	0,067	0,043
GSU1815	-1,242	-0,672	0,570
GSU1816	-0,935	-0,018	0,918
GSU1817	0,044	1,076	1,031
GSU1818	-0,258	0,346	0,604
GSU1819	-0,250	1,403	1,653
GSU1820	-0,256	-0,987	-0,731
GSU1821	-0,947	-1,336	-0,389
GSU1822	-1,158	-0,565	0,593
GSU1824	0,536	-0,271	-0,807
GSU1825	-0,459	-0,262	0,197
GSU1826	-0,928	-0,183	0,745
GSU1827	-0,093	0,781	0,874
GSU1828	1,620	0,779	-0,841
GSU1829	0,747	0,658	-0,088
GSU1830	0,233	0,636	0,402
GSU1831	0,370	-0,569	-0,939

GSU1832	-2,286	-1,071	1,216
GSU1833	-0,583	0,691	1,274
GSU1834	-0,580	-0,107	0,473
GSU1835	0,380	0,613	0,233
GSU1836	0,512	1,344	0,831
GSU1837	-0,583	1,036	1,620
GSU1838	0,710	-1,464	-2,174
GSU1839	0,720	-0,516	-1,236
GSU1840	0,675	-0,609	-1,284
GSU1841	0,123	-1,444	-1,567
GSU1842	-0,119	-0,621	-0,503
GSU1843	0,891	0,797	-0,094
GSU1844	-0,430	2,094	2,524
GSU1845	-0,227	0,235	0,462
GSU1847	0,290	0,774	0,484
GSU1848	-0,206	-0,487	-0,281
GSU1849	0,521	1,077	0,556
GSU1850	-0,758	0,971	1,729
GSU1851	-0,048	0,484	0,532
GSU1852	-1,107	-1,085	0,022
GSU1853	-0,264	-0,438	-0,174
GSU1854	-0,250	0,235	0,485
GSU1855	-0,622	0,839	1,461
GSU1857	-1,056	-0,916	0,140
GSU1858	-0,713	-0,495	0,218
GSU1859	-0,235	0,967	1,202
GSU1860	0,242	0,916	0,674
GSU1861	-0,225	1,427	1,652
GSU1862	1,097	2,189	1,092
GSU1863	-0,879	-0,922	-0,043
GSU1864	0,132	-1,075	-1,207
GSU1865	0,002	-2,002	-2,004
GSU1866	0,494	0,154	-0,341
GSU1867	-0,456	0,577	1,033
GSU1868	-0,222	-0,032	0,190
GSU1869	-0,546	-1,562	-1,016
GSU1870	-0,962	-1,507	-0,544
GSU1871	0,937	0,439	-0,498
GSU1872	1,038	0,085	-0,953
GSU1873	1,144	-1,461	-2,605
GSU1874	-0,162	-1,939	-1,777
GSU1875	-0,445	-0,199	0,246
GSU1876	-0,881	2,154	3,036
GSU1877	-0,664	2,563	3,227
GSU1878	0,160	-0,550	-0,710
GSU1879	0,456	-0,487	-0,944
GSU1880	-0,700	0,458	1,158
GSU1881	0,173	-0,992	-1,165
GSU1882	1,052	-0,095	-1,148
GSU1883	-0,066	0,064	0,130
GSU1884	0,127	-0,387	-0,514
GSU1885	-0,070	-1,164	-1,094
GSU1886	0,364	-0,674	-1,038
GSU1887	-0,294	0,342	0,635
GSU1888	-0,466	0,298	0,763
GSU1889	-0,505	0,650	1,156
GSU1890	-0,597	0,310	0,907
GSU1891	-0,462	-1,035	-0,573
GSU1892	-0,256	-1,545	-1,289
GSU1893	-0,344	-1,659	-1,316
GSU1894	-0,526	-1,481	-0,955
GSU1895	-0,881	-0,834	0,047
GSU1896	-1,190	0,027	1,217
GSU1897	-1,566	0,347	1,913
GSU1898	0,096	-1,930	-2,026
GSU1899	0,657	0,471	-0,185
GSU1900	0,132	0,467	0,335
GSU1901	-0,344	-0,319	0,024
GSU1902	1,599	2,814	1,215
GSU1903	0,920	2,756	1,836
GSU1904	-0,660	1,987	2,647
GSU1905	-0,779	-0,206	0,573
GSU1906	0,304	1,919	1,615
GSU1907	0,733	-0,488	-1,221
GSU1908	-0,154	-1,507	-1,354
GSU1909	0,346	-0,587	-0,933
GSU1910	-0,065	0,152	0,217

GSU1911	0,020	0,258	0,238
GSU1912	-0,836	0,110	0,946
GSU1913	-0,407	-1,366	-0,959
GSU1914	-0,361	-1,195	-0,835
GSU1915	-0,817	-0,876	-0,058
GSU1916	-1,361	-0,300	1,061
GSU1917	-0,935	-0,197	0,738
GSU1918	-0,464	-1,585	-1,121
GSU1919	-0,584	-1,499	-0,915
GSU1920	-0,854	-0,913	-0,058
GSU1921	-0,909	-0,936	-0,027
GSU1922	-0,845	0,603	1,448
GSU1923	-0,213	-0,016	0,197
GSU1924	-0,008	-0,623	-0,615
GSU1925	0,602	2,067	1,464
GSU1926	-0,421	-0,798	-0,377
GSU1927	0,910	1,326	0,416
GSU1928	0,416	1,342	0,926
GSU1929	-0,641	1,378	2,019
GSU1930	2,084	2,349	0,264
GSU1931	0,994	1,585	0,591
GSU1932	1,617	0,170	-1,447
GSU1933	1,291	1,242	-0,049
GSU1934	0,265	0,811	0,546
GSU1935	-0,343	0,687	1,030
GSU1936	-0,358	0,508	0,866
GSU1937	-0,646	0,747	1,392
GSU1938	-0,776	0,791	1,568
GSU1939	0,858	2,445	1,587
GSU1940	1,076	0,216	-0,859
GSU1941	-0,322	-0,683	-0,361
GSU1942	-0,485	-0,035	0,451
GSU1943	1,188	3,789	2,600
GSU1944	-0,020	1,430	1,450
GSU1945	-1,780	-1,468	0,312
GSU1947	-2,232	-2,191	0,041
GSU1948	-2,044	-1,706	0,338
GSU1949	-0,107	2,232	2,339
GSU1950	0,174	1,914	1,740
GSU1951	-0,506	0,961	1,468
GSU1952	0,602	1,438	0,835
GSU1953	0,336	1,591	1,254
GSU1954	0,274	2,704	2,430
GSU1955	0,015	2,680	2,665
GSU1956	0,551	3,000	2,450
GSU1957	-1,546	2,153	3,699
GSU1958	0,169	2,456	2,287
GSU1959	0,016	2,529	2,513
GSU1960	0,735	3,050	2,315
GSU1961	0,280	3,127	2,847
GSU1962	-0,321	2,580	2,901
GSU1963	1,654	3,254	1,600
GSU1964	0,749	3,198	2,449
GSU1965	-0,044	2,970	3,014
GSU1966	0,638	2,944	2,305
GSU1967	0,310	3,377	3,067
GSU1968	1,686	2,752	1,066
GSU1969	1,575	2,841	1,266
GSU1970	2,031	3,919	1,889
GSU1971	2,224	3,098	0,873
GSU1972	1,944	3,322	1,378
GSU1973	2,332	2,445	0,114
GSU1974	3,132	2,883	-0,250
GSU1975	1,960	3,568	1,609
GSU1976	2,802	2,184	-0,618
GSU1977	2,728	2,107	-0,621
GSU1978	1,101	1,418	0,317
GSU1979	2,110	2,052	-0,058
GSU1980	1,370	1,732	0,362
GSU1981	1,788	1,538	-0,250
GSU1982	1,488	1,809	0,321
GSU1983	1,326	0,983	-0,343
GSU1984	0,748	1,184	0,436
GSU1985	-0,292	0,798	1,091
GSU1986	0,097	0,013	-0,084
GSU1987	-0,201	-1,108	-0,907
GSU1988	-1,098	0,653	1,752

GSU1989	-0,061	0,531	0,593
GSU1990	0,322	1,101	0,779
GSU1991	0,021	0,771	0,750
GSU1992	-0,712	1,739	2,451
GSU1994	1,707	4,080	2,373
GSU1995	-0,554	1,217	1,772
GSU1996	-0,997	-0,872	0,125
GSU1997	0,070	0,630	0,560
GSU1998	-1,126	0,253	1,379
GSU1999	-0,341	1,367	1,708
GSU2000	-0,350	-1,490	-1,140
GSU2001	-0,544	-1,804	-1,260
GSU2002	-1,088	-1,168	-0,080
GSU2003	0,451	-0,026	-0,477
GSU2004	0,364	0,317	-0,047
GSU2005	0,136	4,394	4,258
GSU2006	-0,001	1,531	1,532
GSU2007	1,929	3,704	1,775
GSU2008	0,034	2,630	2,596
GSU2009	1,282	2,522	1,240
GSU2010	-0,366	2,349	2,714
GSU2011	-0,539	0,303	0,843
GSU2012	-0,302	1,417	1,719
GSU2013	-0,480	0,286	0,766
GSU2014	-0,121	0,993	1,114
GSU2015	-0,795	0,536	1,331
GSU2016	0,189	1,604	1,415
GSU2017	-0,722	-3,133	-2,412
GSU2018	-0,682	-1,814	-1,132
GSU2019	-0,524	-1,267	-0,743
GSU2020	-0,639	-0,688	-0,048
GSU2021	-1,344	-1,662	-0,318
GSU2022	-0,764	-0,312	0,452
GSU2023	0,060	-1,053	-1,113
GSU2024	-0,194	-0,294	-0,100
GSU2025	-0,750	-0,958	-0,208
GSU2026	1,099	-0,171	-1,270
GSU2027	-0,832	-0,560	0,272
GSU2028	0,133	0,633	0,500
GSU2029	-0,091	0,294	0,385
GSU2030	-0,357	0,009	0,366
GSU2031	-0,276	0,115	0,392
GSU2032	-0,690	-0,067	0,623
GSU2033	-1,310	-0,125	1,185
GSU2034	-0,061	2,869	2,929
GSU2035	0,870	2,116	1,246
GSU2036	2,691	2,744	0,053
GSU2037	-0,252	1,831	2,082
GSU2038	0,710	2,742	2,031
GSU2039	-1,028	1,393	2,421
GSU2041	0,073	-0,008	-0,081
GSU2042	-0,684	-0,691	-0,007
GSU2043	0,913	-0,501	-1,414
GSU2044	-0,418	-0,553	-0,135
GSU2045	-0,738	-0,700	0,038
GSU2046	-1,066	0,720	1,787
GSU2047	0,157	-0,182	-0,339
GSU2048	-0,225	-1,292	-1,067
GSU2049	-0,335	-0,998	-0,663
GSU2050	-0,602	0,037	0,638
GSU2051	0,637	0,053	-0,583
GSU2052	0,695	0,302	-0,393
GSU2053	-0,318	-0,421	-0,103
GSU2055	1,475	2,130	0,655
GSU2056	1,163	1,008	-0,155
GSU2057	1,054	1,971	0,918
GSU2059	0,580	0,729	0,150
GSU2060	0,028	-0,174	-0,202
GSU2061	-0,185	0,278	0,464
GSU2062	0,672	-0,887	-1,559
GSU2063	-0,901	-0,354	0,547
GSU2064	0,529	-0,865	-1,395
GSU2065	-0,756	-1,190	-0,434
GSU2066	-0,275	0,779	1,055
GSU2067	0,264	0,911	0,647
GSU2068	1,105	1,259	0,154
GSU2069	-0,149	-1,045	-0,896

GSU2070	0,153	-0,108	-0,260
GSU2071	-0,593	-0,492	0,101
GSU2072	-0,821	-0,095	0,727
GSU2073	2,167	3,926	1,759
GSU2074	1,785	1,973	0,187
GSU2075	1,246	1,449	0,203
GSU2076	1,360	2,847	1,487
GSU2077	-0,286	-2,414	-2,128
GSU2078	1,219	0,519	-0,700
GSU2079	-0,357	-0,670	-0,313
GSU2080	-0,187	-0,071	0,116
GSU2081	-0,025	-0,861	-0,836
GSU2082	-1,266	-0,557	0,708
GSU2083	-0,522	-0,445	0,077
GSU2084	-0,398	-2,319	-1,922
GSU2085	-0,685	-1,922	-1,237
GSU2086	-0,913	-1,712	-0,799
GSU2087	-1,163	-1,222	-0,060
GSU2088	-1,248	-2,049	-0,801
GSU2089	-1,252	-1,325	-0,073
GSU2090	-0,989	-0,690	0,298
GSU2091	-1,062	-0,911	0,150
GSU2092	0,157	-2,154	-2,311
GSU2093	-1,307	-2,314	-1,007
GSU2094	1,493	0,111	-1,382
GSU2095	0,846	1,284	0,438
GSU2096	-1,007	0,571	1,578
GSU2097	-0,051	1,042	1,093
GSU2098	-1,706	1,597	3,303
GSU2099	-0,286	-0,621	-0,335
GSU2100	0,238	1,356	1,118
GSU2101	-1,473	0,199	1,673
GSU2102	-0,786	-0,358	0,428
GSU2104	-0,882	0,037	0,919
GSU2105	0,362	1,353	0,990
GSU2106	0,169	0,459	0,290
GSU2107	-0,089	-0,242	-0,152
GSU2108	-0,763	-1,233	-0,470
GSU2109	-1,195	-0,574	0,621
GSU2110	-1,664	-1,303	0,361
GSU2112	-0,504	2,463	2,968
GSU2113	-0,591	-0,490	0,100
GSU2114	1,388	0,468	-0,920
GSU2115	-0,417	0,366	0,782
GSU2116	-0,224	0,608	0,832
GSU2117	NA	NA	NA
GSU2118	-0,859	-0,606	0,253
GSU2119	-0,666	1,340	2,006
GSU2120	-1,223	-0,548	0,675
GSU2121	1,453	0,152	-1,301
GSU2122	0,631	-1,548	-2,179
GSU2123	1,511	-0,031	-1,543
GSU2124	1,943	0,046	-1,897
GSU2125	1,998	1,263	-0,736
GSU2127	0,792	-0,833	-1,625
GSU2128	0,685	-0,739	-1,424
GSU2129	2,039	2,137	0,099
GSU2131	2,272	0,179	-2,093
GSU2132	2,037	2,281	0,244
GSU2133	2,035	2,405	0,370
GSU2134	2,852	1,740	-1,112
GSU2135	1,328	1,772	0,443
GSU2136	2,099	3,694	1,595
GSU2137	-0,470	3,563	4,033
GSU2139	NA	NA	NA
GSU2140	-0,406	-0,645	-0,238
GSU2143	-1,156	0,395	1,551
GSU2144	-1,846	-0,308	1,538
GSU2145	-2,038	0,240	2,279
GSU2146	-2,037	-0,434	1,603
GSU2147	-0,360	1,040	1,400
GSU2148	-0,469	1,561	2,030
GSU2149	-1,033	2,172	3,204
GSU2151	-1,100	0,009	1,108
GSU2152	0,120	1,301	1,181
GSU2153	NA	NA	NA
GSU2154	-0,206	-0,487	-0,281

GSU2155	NA	NA	NA
GSU2156	NA	NA	NA
GSU2157	-0,206	-0,487	-0,281
GSU2158	0,351	1,217	0,866
GSU2159	NA	NA	NA
GSU2160	1,829	-0,388	-2,217
GSU2161	-0,533	-0,746	-0,213
GSU2162	NA	NA	NA
GSU2163	NA	NA	NA
GSU2164	-0,828	-0,141	0,688
GSU2165	-0,206	-0,487	-0,281
GSU2166	-0,206	-0,487	-0,281
GSU2167	-0,533	-0,746	-0,213
GSU2168	-0,061	0,420	0,481
GSU2170	NA	NA	NA
GSU2171	-0,321	0,122	0,444
GSU2172	0,946	0,369	-0,577
GSU2173	-0,206	-0,487	-0,281
GSU2174	0,900	0,886	-0,015
GSU2175	-0,310	0,010	0,320
GSU2176	0,123	-0,357	-0,480
GSU2177	2,073	0,720	-1,353
GSU2178	0,918	0,760	-0,157
GSU2180	NA	NA	NA
GSU2182	-0,828	-0,141	0,688
GSU2183	-0,081	1,881	1,963
GSU2184	-0,536	-1,070	-0,534
GSU2185	-1,010	-0,158	0,851
GSU2186	-0,513	-0,108	0,405
GSU2187	0,533	-0,425	-0,958
GSU2188	-0,026	0,096	0,122
GSU2189	-0,733	0,227	0,960
GSU2190	0,605	-1,034	-1,639
GSU2191	-0,320	-0,828	-0,507
GSU2192	-0,894	0,003	0,897
GSU2193	0,133	2,285	2,152
GSU2194	-0,378	-0,947	-0,569
GSU2195	-0,799	-0,536	0,263
GSU2196	-0,074	-0,495	-0,420
GSU2197	-0,150	-0,375	-0,226
GSU2198	-0,440	0,708	1,149
GSU2199	1,051	3,113	2,062
GSU2200	0,164	1,024	0,860
GSU2201	0,536	1,479	0,943
GSU2202	0,781	1,733	0,952
GSU2203	1,683	1,504	-0,179
GSU2204	-0,452	1,903	2,354
GSU2205	2,345	2,300	-0,045
GSU2206	-0,686	-0,449	0,237
GSU2207	-0,344	-2,073	-1,729
GSU2208	0,126	-1,528	-1,655
GSU2209	-0,778	-1,145	-0,368
GSU2210	0,713	1,234	0,521
GSU2211	NA	NA	NA
GSU2212	-0,172	1,562	1,734
GSU2213	1,290	1,140	-0,151
GSU2214	2,066	1,694	-0,372
GSU2215	1,227	1,027	-0,200
GSU2216	0,841	0,609	-0,232
GSU2217	-0,599	-0,151	0,449
GSU2218	0,376	0,556	0,180
GSU2219	0,334	1,504	1,170
GSU2220	-0,108	-0,267	-0,160
GSU2221	0,054	-0,778	-0,832
GSU2222	-0,218	-0,601	-0,383
GSU2223	0,003	-0,133	-0,136
GSU2224	-0,282	-1,064	-0,782
GSU2225	-0,753	-0,946	-0,193
GSU2226	-0,650	-0,776	-0,126
GSU2227	-0,577	-1,290	-0,713
GSU2228	-1,139	-0,794	0,345
GSU2229	-1,378	-1,676	-0,298
GSU2230	-0,738	-1,163	-0,425
GSU2231	-0,036	-0,385	-0,348
GSU2232	0,102	-0,519	-0,621
GSU2233	-0,386	0,070	0,456
GSU2234	-1,149	-1,622	-0,473

GSU2235	0,083	-0,748	-0,831
GSU2236	-0,728	0,031	0,759
GSU2237	-0,544	0,232	0,776
GSU2238	-0,746	0,076	0,822
GSU2239	0,598	-0,337	-0,935
GSU2240	-0,134	-0,435	-0,301
GSU2241	-0,977	-0,865	0,112
GSU2242	0,537	0,830	0,293
GSU2243	-0,613	0,398	1,011
GSU2244	-0,219	1,545	1,764
GSU2245	0,528	0,717	0,189
GSU2246	-0,186	0,709	0,895
GSU2247	-0,359	0,268	0,627
GSU2248	0,118	0,253	0,135
GSU2249	0,027	0,557	0,531
GSU2250	-1,135	0,217	1,351
GSU2251	0,276	1,124	0,848
GSU2252	1,458	0,177	-1,281
GSU2253	-1,060	-1,174	-0,114
GSU2254	-0,192	0,464	0,656
GSU2255	0,797	-0,404	-1,201
GSU2256	-0,629	-1,070	-0,441
GSU2257	-0,637	-1,677	-1,040
GSU2258	1,981	0,619	-1,362
GSU2259	1,324	0,705	-0,619
GSU2260	1,131	-0,408	-1,539
GSU2261	1,017	-1,016	-2,033
GSU2262	1,160	0,089	-1,071
GSU2263	0,499	-0,954	-1,453
GSU2264	0,408	-1,386	-1,793
GSU2265	0,047	-1,073	-1,120
GSU2266	0,319	-1,091	-1,410
GSU2267	0,433	-0,720	-1,153
GSU2268	-0,542	-1,014	-0,473
GSU2269	-1,130	-1,439	-0,309
GSU2270	-0,626	-1,157	-0,530
GSU2271	-0,625	-0,942	-0,317
GSU2272	1,644	0,850	-0,793
GSU2274	0,022	-1,298	-1,320
GSU2275	1,161	-0,065	-1,226
GSU2276	0,181	0,183	0,001
GSU2277	-0,065	-0,761	-0,696
GSU2278	0,204	-0,444	-0,648
GSU2279	-0,706	-0,945	-0,239
GSU2280	NA	NA	NA
GSU2282	0,022	-0,584	-0,605
GSU2283	-0,430	-0,519	-0,090
GSU2284	0,152	0,065	-0,087
GSU2285	-0,840	0,230	1,069
GSU2286	0,298	-0,504	-0,802
GSU2287	-0,671	0,124	0,796
GSU2288	-0,691	-0,412	0,279
GSU2289	-0,039	0,465	0,504
GSU2290	0,277	1,404	1,127
GSU2291	-0,031	1,884	1,915
GSU2292	0,157	1,252	1,094
GSU2293	-0,982	0,324	1,306
GSU2294	1,303	4,097	2,794
GSU2295	-1,111	0,319	1,430
GSU2296	-1,018	0,908	1,925
GSU2297	-0,846	1,032	1,878
GSU2298	-0,725	0,081	0,806
GSU2299	0,286	2,603	2,317
GSU2300	NA	NA	NA
GSU2301	-0,754	2,335	3,089
GSU2302	-1,201	1,615	2,816
GSU2303	-0,819	0,821	1,641
GSU2304	-0,762	0,785	1,547
GSU2305	-0,239	0,736	0,975
GSU2306	-0,705	-1,216	-0,511
GSU2307	0,394	-0,657	-1,051
GSU2308	-1,056	-0,630	0,426
GSU2309	1,924	2,396	0,472
GSU2310	1,828	1,850	0,021
GSU2311	2,122	1,376	-0,747
GSU2312	1,425	2,086	0,661
GSU2313	2,177	2,373	0,196

GSU2314	1,497	1,646	0,149
GSU2315	1,422	0,853	-0,569
GSU2316	-0,983	0,712	1,694
GSU2317	-1,043	0,062	1,104
GSU2318	0,504	-0,361	-0,865
GSU2319	-0,066	-0,749	-0,683
GSU2320	-2,080	-2,622	-0,542
GSU2321	0,789	-0,650	-1,439
GSU2322	-1,093	-1,401	-0,308
GSU2323	-1,908	-0,784	1,124
GSU2324	-1,142	-0,254	0,888
GSU2325	0,096	-0,245	-0,341
GSU2326	-0,321	0,122	0,444
GSU2327	-0,464	1,321	1,785
GSU2328	-0,457	0,783	1,240
GSU2329	0,070	1,960	1,889
GSU2330	1,174	0,235	-0,938
GSU2331	NA	NA	NA
GSU2332	-1,294	-0,552	0,742
GSU2333	0,011	-0,289	-0,300
GSU2335	-0,001	-1,157	-1,155
GSU2336	2,039	2,137	0,099
GSU2337	2,230	2,406	0,176
GSU2338	2,205	3,549	1,344
GSU2339	0,120	1,301	1,181
GSU2340	0,030	0,933	0,903
GSU2341	1,996	0,969	-1,026
GSU2342	-0,224	0,608	0,832
GSU2343	0,120	1,301	1,181
GSU2344	0,445	-0,103	-0,548
GSU2345	0,621	-0,320	-0,941
GSU2346	-0,170	-0,602	-0,433
GSU2347	-0,039	-0,415	-0,376
GSU2348	-0,726	-0,819	-0,093
GSU2350	0,445	-0,369	-0,814
GSU2351	1,913	2,729	0,816
GSU2352	-0,096	3,841	3,937
GSU2353	0,309	4,100	3,791
GSU2354	-0,004	1,331	1,335
GSU2355	-0,016	1,276	1,292
GSU2357	-0,755	1,739	2,494
GSU2358	-0,509	1,610	2,120
GSU2359	1,158	1,599	0,441
GSU2360	0,551	1,796	1,245
GSU2361	1,683	2,489	0,806
GSU2362	-0,471	-0,952	-0,481
GSU2363	-0,343	-0,686	-0,343
GSU2364	0,458	0,108	-0,350
GSU2365	1,293	-0,543	-1,836
GSU2366	0,608	-0,875	-1,483
GSU2367	-0,199	-0,466	-0,266
GSU2368	-0,723	-1,098	-0,375
GSU2370	-0,295	-1,154	-0,859
GSU2371	0,120	-0,679	-0,799
GSU2372	-0,230	-0,108	0,122
GSU2373	-0,940	1,444	2,384
GSU2374	-0,738	1,678	2,416
GSU2375	-0,611	-0,530	0,080
GSU2376	0,942	1,422	0,480
GSU2377	-0,289	1,530	1,819
GSU2378	-0,302	-0,191	0,112
GSU2379	0,795	-0,464	-1,258
GSU2380	-0,001	-0,276	-0,274
GSU2381	-0,125	-1,052	-0,927
GSU2382	-0,739	-1,326	-0,587
GSU2383	-0,771	-0,821	-0,050
GSU2384	0,452	0,260	-0,192
GSU2385	-1,111	-0,848	0,263
GSU2386	1,446	-1,413	-2,859
GSU2387	-0,973	-0,050	0,923
GSU2388	0,668	0,696	0,028
GSU2389	-0,655	0,329	0,984
GSU2390	-1,743	-0,558	1,185
GSU2391	-0,575	0,170	0,745
GSU2392	NA	NA	NA
GSU2395	1,003	1,109	0,106
GSU2396	-0,479	0,195	0,674

GSU2397	-1,370	0,012	1,382
GSU2398	0,772	2,015	1,243
GSU2399	0,388	1,183	0,796
GSU2400	0,147	-1,101	-1,248
GSU2401	0,015	-0,212	-0,227
GSU2402	-1,846	-0,308	1,538
GSU2403	-1,839	-0,105	1,734
GSU2404	-2,036	0,768	2,805
GSU2405	0,104	0,745	0,641
GSU2406	-1,309	0,645	1,954
GSU2407	-1,545	1,480	3,025
GSU2408	-0,999	2,743	3,742
GSU2409	-1,128	1,623	2,751
GSU2410	-0,781	1,756	2,537
GSU2411	-0,713	-1,189	-0,476
GSU2412	-0,235	-0,058	0,177
GSU2413	-0,004	-0,903	-0,899
GSU2414	0,536	-0,196	-0,732
GSU2415	1,294	0,376	-0,918
GSU2416	2,370	1,898	-0,472
GSU2417	-0,061	0,420	0,481
GSU2418	-0,406	-0,645	-0,238
GSU2419	-0,575	0,170	0,745
GSU2420	NA	NA	NA
GSU2421	1,829	-0,388	-2,217
GSU2422	NA	NA	NA
GSU2423	-0,618	1,030	1,648
GSU2424	-0,168	-3,137	-2,969
GSU2425	-0,458	-1,391	-0,933
GSU2426	-0,196	-1,109	-0,913
GSU2427	-0,445	-0,841	-0,395
GSU2428	1,383	3,425	2,042
GSU2429	-0,358	0,511	0,869
GSU2430	1,440	1,923	0,483
GSU2431	0,565	1,004	0,439
GSU2432	2,341	-0,087	-2,428
GSU2433	0,630	0,215	-0,414
GSU2434	0,060	-1,521	-1,581
GSU2435	1,045	1,526	0,481
GSU2436	0,404	1,358	0,954
GSU2437	0,711	1,484	0,773
GSU2438	0,653	0,838	0,185
GSU2439	-1,970	0,167	2,138
GSU2440	0,049	2,719	2,670
GSU2441	0,241	2,866	2,625
GSU2442	1,428	3,178	1,751
GSU2443	0,457	2,845	2,388
GSU2444	2,672	3,300	0,628
GSU2445	1,531	3,016	1,485
GSU2446	1,337	1,487	0,150
GSU2447	0,362	1,353	0,990
GSU2448	-0,173	0,919	1,091
GSU2449	-0,120	0,528	0,648
GSU2450	1,960	0,612	-1,349
GSU2451	2,196	1,519	-0,678
GSU2452	1,109	0,534	-0,575
GSU2453	1,588	0,540	-1,048
GSU2454	0,333	-1,083	-1,416
GSU2455	0,023	-0,659	-0,682
GSU2456	0,145	0,176	0,031
GSU2457	-0,260	-1,093	-0,833
GSU2458	-0,551	-0,259	0,292
GSU2460	-0,416	-1,314	-0,898
GSU2461	0,446	0,215	-0,232
GSU2462	-0,685	-1,267	-0,582
GSU2463	-0,205	-1,209	-1,003
GSU2465	-0,994	-0,015	0,979
GSU2466	-0,891	-0,216	0,675
GSU2467	0,501	-0,085	-0,586
GSU2468	-1,010	-0,094	0,917
GSU2469	1,469	1,753	0,284
GSU2470	1,268	0,618	-0,649
GSU2471	-0,172	1,562	1,734
GSU2472	-0,589	2,526	3,115
GSU2473	-1,337	2,615	3,952
GSU2475	0,458	1,116	0,658
GSU2476	0,331	0,018	-0,313

GSU2477	0,077	-0,388	-0,465
GSU2478	0,334	-1,127	-1,460
GSU2479	-0,533	-0,746	-0,213
GSU2480	-0,072	0,552	0,623
GSU2481	1,004	0,971	-0,032
GSU2482	1,813	0,929	-0,884
GSU2483	-0,016	1,142	1,158
GSU2484	2,427	1,439	-0,989
GSU2485	-0,931	0,467	1,398
GSU2486	-0,157	-0,039	0,117
GSU2487	-0,718	-0,890	-0,172
GSU2488	0,967	-1,633	-2,600
GSU2489	-1,062	0,256	1,317
GSU2490	-0,194	4,317	4,511
GSU2491	-1,316	-0,020	1,296
GSU2492	1,191	0,619	-0,571
GSU2493	1,801	2,417	0,616
GSU2494	1,641	2,558	0,918
GSU2495	1,659	2,086	0,427
GSU2496	0,850	1,496	0,646
GSU2497	-0,531	1,107	1,638
GSU2498	-0,842	-0,608	0,233
GSU2499	0,549	-0,065	-0,615
GSU2501	-1,152	-2,049	-0,897
GSU2502	-0,701	-2,458	-1,757
GSU2503	-0,091	-1,469	-1,379
GSU2504	-0,341	-1,661	-1,321
GSU2505	-1,043	-2,721	-1,678
GSU2506	-0,801	-1,980	-1,178
GSU2507	-1,154	-1,834	-0,680
GSU2508	-1,900	-1,290	0,610
GSU2509	-0,434	-2,157	-1,723
GSU2510	-1,196	-0,587	0,609
GSU2511	0,445	-0,369	-0,814
GSU2512	-2,107	-0,185	1,922
GSU2513	0,862	1,110	0,249
GSU2515	-1,412	-3,097	-1,686
GSU2516	0,802	-0,138	-0,940
GSU2517	0,098	-1,405	-1,502
GSU2518	0,161	-1,187	-1,348
GSU2519	0,067	-0,803	-0,870
GSU2520	-0,553	-0,558	-0,005
GSU2521	0,203	0,598	0,396
GSU2523	-0,703	-0,480	0,223
GSU2524	-0,937	-1,104	-0,167
GSU2525	0,624	0,744	0,121
GSU2526	-0,313	1,802	2,115
GSU2527	0,016	3,922	3,906
GSU2528	-0,208	0,098	0,306
GSU2529	-1,099	-0,382	0,717
GSU2530	-0,666	-0,508	0,158
GSU2531	-0,016	1,338	1,354
GSU2532	-0,575	0,170	0,745
GSU2533	-1,576	0,014	1,590
GSU2534	0,029	-0,026	-0,055
GSU2535	-0,831	0,778	1,609
GSU2536	0,604	-0,903	-1,506
GSU2537	0,010	-1,239	-1,249
GSU2538	0,049	-0,789	-0,838
GSU2539	-0,820	-0,590	0,230
GSU2540	-1,458	-0,134	1,324
GSU2541	-0,284	-1,351	-1,067
GSU2542	-0,929	0,214	1,142
GSU2543	-0,036	0,228	0,264
GSU2544	0,632	-0,716	-1,348
GSU2545	-0,348	-0,871	-0,523
GSU2546	-0,205	0,862	1,067
GSU2547	0,299	-1,271	-1,570
GSU2548	-0,728	-2,302	-1,574
GSU2549	-0,290	-1,000	-0,709
GSU2550	0,105	-1,378	-1,483
GSU2551	0,090	-0,288	-0,378
GSU2552	-0,992	-1,440	-0,448
GSU2553	-0,707	-0,701	0,006
GSU2554	0,177	0,711	0,535
GSU2555	0,121	0,206	0,085
GSU2556	0,031	-0,726	-0,757

GSU2557	0,719	-0,326	-1,045
GSU2558	-1,100	0,009	1,108
GSU2559	-0,013	-0,138	-0,125
GSU2560	0,029	2,068	2,039
GSU2561	1,258	3,436	2,178
GSU2562	0,648	2,426	1,778
GSU2563	0,070	0,509	0,439
GSU2564	-0,345	0,203	0,548
GSU2565	0,004	-0,052	-0,056
GSU2567	0,752	1,147	0,395
GSU2568	-0,188	-2,180	-1,992
GSU2569	-0,571	-1,336	-0,765
GSU2570	-0,465	-1,182	-0,718
GSU2571	-0,586	0,591	1,178
GSU2572	-0,653	1,358	2,011
GSU2573	-0,290	0,988	1,278
GSU2574	-0,061	-1,069	-1,008
GSU2575	-0,179	1,126	1,304
GSU2576	0,751	-0,489	-1,240
GSU2577	0,429	-0,818	-1,247
GSU2578	-0,706	-0,945	-0,239
GSU2579	-2,298	-1,920	0,377
GSU2580	-1,402	-0,837	0,566
GSU2581	-0,320	-0,231	0,089
GSU2583	0,483	2,788	2,304
GSU2584	0,874	3,252	2,378
GSU2585	0,529	3,372	2,843
GSU2586	-0,282	1,363	1,645
GSU2587	-0,976	1,705	2,681
GSU2588	0,351	0,518	0,168
GSU2590	0,005	0,850	0,846
GSU2591	-0,061	0,420	0,481
GSU2592	0,366	1,419	1,053
GSU2593	NA	NA	NA
GSU2594	NA	NA	NA
GSU2596	-0,176	2,325	2,502
GSU2597	0,591	2,276	1,685
GSU2599	0,351	1,217	0,866
GSU2601	-0,430	0,024	0,453
GSU2602	0,298	-0,379	-0,677
GSU2603	0,031	-0,136	-0,167
GSU2604	-0,358	-1,435	-1,077
GSU2605	-0,453	-1,903	-1,450
GSU2606	-0,819	-1,896	-1,077
GSU2607	-0,610	-1,289	-0,679
GSU2608	-0,888	-0,523	0,366
GSU2609	1,099	-0,248	-1,346
GSU2610	0,337	-0,751	-1,089
GSU2611	0,367	0,104	-0,263
GSU2612	1,345	-0,310	-1,655
GSU2613	-0,169	-1,143	-0,974
GSU2614	0,585	-2,830	-3,415
GSU2615	1,076	-1,064	-2,139
GSU2616	0,778	-0,986	-1,763
GSU2617	0,571	-1,150	-1,722
GSU2618	0,901	-0,728	-1,629
GSU2619	-0,382	-1,574	-1,192
GSU2620	-1,019	-1,657	-0,638
GSU2621	-0,735	-0,789	-0,054
GSU2622	1,029	1,439	0,411
GSU2623	-0,596	-0,846	-0,250
GSU2624	0,150	-0,306	-0,456
GSU2625	-0,407	1,284	1,691
GSU2626	-0,776	-0,145	0,631
GSU2627	-0,595	-1,631	-1,036
GSU2628	-2,278	-1,258	1,020
GSU2629	-2,286	-0,708	1,578
GSU2630	-0,982	-1,016	-0,034
GSU2631	-0,946	-0,783	0,163
GSU2632	-0,120	-0,081	0,040
GSU2633	-0,474	-0,162	0,312
GSU2634	-0,156	2,333	2,489
GSU2635	1,289	2,552	1,264
GSU2636	1,854	2,970	1,116
GSU2637	1,309	3,562	2,253
GSU2638	1,305	0,570	-0,735
GSU2639	0,308	0,063	-0,245

GSU2640	0,856	0,690	-0,166
GSU2641	0,874	1,530	0,655
GSU2642	-0,123	0,744	0,867
GSU2643	-0,198	0,958	1,156
GSU2644	0,821	0,917	0,096
GSU2645	1,094	1,567	0,473
GSU2646	-0,321	0,122	0,444
GSU2647	0,226	-0,837	-1,063
GSU2648	0,385	0,787	0,402
GSU2649	0,109	-0,525	-0,634
GSU2650	-0,363	-1,127	-0,765
GSU2651	0,259	-0,226	-0,485
GSU2652	0,836	1,461	0,624
GSU2653	0,514	0,598	0,084
GSU2654	0,055	0,401	0,346
GSU2655	1,043	-1,138	-2,181
GSU2656	0,475	2,253	1,778
GSU2657	-0,221	-0,189	0,031
GSU2659	-0,224	0,608	0,832
GSU2660	-0,413	1,006	1,419
GSU2661	0,619	-0,031	-0,649
GSU2662	-3,343	-2,042	1,300
GSU2663	-1,870	-0,496	1,374
GSU2664	-2,177	-1,893	0,284
GSU2665	-2,239	-0,526	1,713
GSU2666	-1,742	-0,051	1,691
GSU2667	-1,217	0,209	1,426
GSU2668	-0,419	1,558	1,976
GSU2669	-1,478	0,658	2,136
GSU2670	1,361	2,286	0,925
GSU2671	-1,566	0,307	1,873
GSU2672	-0,111	0,720	0,830
GSU2673	1,130	0,558	-0,572
GSU2674	-0,177	0,486	0,663
GSU2675	0,308	1,164	0,856
GSU2676	-1,156	-0,394	0,762
GSU2677	-0,981	-1,590	-0,609
GSU2678	-0,944	0,439	1,384
GSU2679	-0,719	-0,498	0,221
GSU2680	-0,481	-0,069	0,412
GSU2681	0,205	-0,242	-0,447
GSU2682	0,072	-0,677	-0,749
GSU2683	-0,615	-1,537	-0,922
GSU2684	-0,710	0,004	0,714
GSU2685	2,024	1,497	-0,527
GSU2686	1,928	1,384	-0,544
GSU2687	-1,104	1,263	2,367
GSU2688	-0,206	-0,487	-0,281
GSU2689	NA	NA	NA
GSU2690	-0,099	0,142	0,241
GSU2691	0,839	0,173	-0,666
GSU2692	-0,490	-1,322	-0,831
GSU2693	-0,012	-2,389	-2,377
GSU2695	0,075	-3,112	-3,187
GSU2696	-0,492	-2,522	-2,030
GSU2697	-0,837	-1,438	-0,601
GSU2698	-0,711	0,740	1,452
GSU2699	-0,935	-2,968	-2,033
GSU2700	-0,528	-2,626	-2,098
GSU2701	-0,398	-2,132	-1,734
GSU2702	-0,623	-2,545	-1,922
GSU2703	-0,553	-2,202	-1,649
GSU2704	0,162	-2,213	-2,375
GSU2705	0,972	-0,992	-1,964
GSU2706	0,253	2,415	2,162
GSU2707	-0,061	3,328	3,389
GSU2708	1,067	1,312	0,245
GSU2710	-0,849	0,662	1,511
GSU2713	-0,283	0,623	0,906
GSU2714	0,381	1,071	0,690
GSU2715	0,410	1,200	0,790
GSU2716	-0,066	-2,266	-2,199
GSU2717	0,586	-0,398	-0,984
GSU2718	1,224	0,491	-0,733
GSU2719	-0,002	-0,273	-0,271
GSU2720	0,617	-0,074	-0,691
GSU2721	-0,599	-0,949	-0,351

GSU2722	-0,725	-0,640	0,084
GSU2723	0,154	2,376	2,222
GSU2724	1,609	3,109	1,500
GSU2725	-0,156	2,333	2,489
GSU2726	1,237	1,342	0,104
GSU2727	-2,280	-2,663	-0,384
GSU2728	0,516	-0,853	-1,369
GSU2730	0,173	0,413	0,240
GSU2731	1,507	4,180	2,672
GSU2732	NA	NA	NA
GSU2733	1,672	3,131	1,460
GSU2735	-1,127	0,312	1,438
GSU2737	1,693	1,643	-0,051
GSU2738	NA	NA	NA
GSU2739	1,605	0,221	-1,384
GSU2741	1,565	0,364	-1,201
GSU2742	0,284	0,648	0,365
GSU2743	0,729	0,152	-0,576
GSU2744	0,640	-0,179	-0,819
GSU2745	-0,676	-0,115	0,561
GSU2746	-0,666	-0,298	0,368
GSU2747	0,912	2,375	1,462
GSU2748	-0,753	-1,190	-0,437
GSU2749	0,306	-0,809	-1,115
GSU2750	1,535	2,659	1,123
GSU2751	-0,339	2,532	2,871
GSU2753	1,060	1,613	0,553
GSU2755	0,343	-0,866	-1,209
GSU2756	-1,249	-2,009	-0,760
GSU2758	0,083	-1,499	-1,582
GSU2759	0,200	-0,587	-0,787
GSU2760	-0,748	-0,122	0,626
GSU2761	1,451	-0,444	-1,895
GSU2762	1,143	-0,774	-1,916
GSU2763	0,674	0,228	-0,446
GSU2764	-0,732	-0,720	0,011
GSU2766	-0,714	-1,070	-0,355
GSU2767	-0,390	-0,640	-0,250
GSU2768	0,376	2,416	2,040
GSU2769	-0,176	1,406	1,582
GSU2770	0,269	2,437	2,168
GSU2771	0,732	2,230	1,498
GSU2772	-0,361	2,149	2,510
GSU2773	1,354	2,907	1,553
GSU2774	-0,840	2,241	3,081
GSU2775	-1,217	-0,344	0,873
GSU2776	0,210	0,180	-0,030
GSU2777	-0,616	-0,954	-0,338
GSU2778	-0,095	-0,693	-0,599
GSU2779	1,106	-0,727	-1,833
GSU2780	1,278	3,362	2,084
GSU2781	0,105	-0,421	-0,526
GSU2782	0,200	-0,632	-0,832
GSU2783	0,012	0,123	0,111
GSU2784	1,053	0,696	-0,357
GSU2785	-0,787	1,743	2,530
GSU2786	-0,349	-0,123	0,226
GSU2787	-1,806	1,269	3,075
GSU2788	0,022	1,018	0,996
GSU2789	-0,860	-0,318	0,542
GSU2790	0,477	-0,514	-0,992
GSU2791	0,679	-0,039	-0,718
GSU2792	-1,290	-0,799	0,490
GSU2793	0,319	0,086	-0,233
GSU2794	-0,525	0,122	0,647
GSU2795	1,023	-0,840	-1,863
GSU2796	0,636	-0,625	-1,261
GSU2797	0,468	-0,784	-1,252
GSU2798	1,970	0,617	-1,353
GSU2799	2,588	-0,310	-2,898
GSU2800	-1,276	-1,050	0,225
GSU2801	1,142	2,305	1,164
GSU2802	-0,853	-1,117	-0,264
GSU2803	1,829	-0,388	-2,217
GSU2804	-0,206	-0,487	-0,281
GSU2805	1,951	-0,916	-2,867
GSU2806	1,111	-1,186	-2,297

GSU2807	0,351	-1,151	-1,503
GSU2808	0,603	1,223	0,620
GSU2809	0,038	1,246	1,208
GSU2811	0,605	1,129	0,524
GSU2812	1,263	1,156	-0,107
GSU2813	1,442	1,055	-0,387
GSU2814	0,515	0,065	-0,450
GSU2815	-1,492	-0,934	0,558
GSU2816	-0,458	1,248	1,706
GSU2817	-0,807	2,053	2,860
GSU2818	-0,221	-1,615	-1,394
GSU2819	1,388	0,468	-0,920
GSU2820	2,531	-0,028	-2,559
GSU2821	2,370	0,239	-2,131
GSU2822	1,876	0,140	-1,736
GSU2823	0,113	-0,619	-0,732
GSU2825	0,736	1,739	1,003
GSU2826	1,286	2,098	0,812
GSU2827	-0,862	-1,237	-0,375
GSU2828	-1,035	-0,951	0,083
GSU2829	-0,792	-2,133	-1,341
GSU2830	-0,138	-1,777	-1,639
GSU2831	-0,295	-1,505	-1,210
GSU2832	-0,339	-1,719	-1,379
GSU2833	-0,348	-1,680	-1,333
GSU2834	-0,550	-1,733	-1,183
GSU2835	-0,550	-1,193	-0,643
GSU2836	-1,030	-1,183	-0,153
GSU2837	-0,480	-1,322	-0,841
GSU2838	1,410	0,316	-1,094
GSU2839	1,196	0,698	-0,498
GSU2840	1,268	-0,035	-1,304
GSU2841	1,509	-0,070	-1,579
GSU2842	1,043	-0,279	-1,322
GSU2843	0,736	-0,534	-1,270
GSU2844	0,780	-0,151	-0,932
GSU2845	1,228	-0,197	-1,425
GSU2846	1,238	-0,179	-1,417
GSU2847	0,994	-1,015	-2,008
GSU2848	1,078	-0,132	-1,210
GSU2849	0,787	-1,266	-2,052
GSU2850	0,461	-1,314	-1,775
GSU2851	0,579	-1,601	-2,180
GSU2852	0,549	-1,346	-1,895
GSU2853	0,646	-1,044	-1,690
GSU2854	0,332	-1,493	-1,825
GSU2855	0,425	-1,483	-1,908
GSU2856	0,122	-1,768	-1,890
GSU2857	-0,128	-1,761	-1,633
GSU2858	-0,151	-1,159	-1,008
GSU2859	0,328	-1,082	-1,411
GSU2860	-0,402	-0,441	-0,040
GSU2861	-0,589	0,307	0,896
GSU2862	0,203	-0,670	-0,873
GSU2863	0,309	-1,317	-1,626
GSU2864	-0,019	-2,416	-2,398
GSU2865	-0,024	-1,528	-1,504
GSU2866	-0,241	-2,294	-2,053
GSU2867	-0,087	-1,314	-1,227
GSU2868	-0,311	-1,133	-0,822
GSU2869	-0,540	-1,195	-0,655
GSU2870	-0,521	-1,106	-0,585
GSU2871	-0,720	-1,411	-0,691
GSU2872	0,041	-1,878	-1,919
GSU2873	-0,461	-2,389	-1,929
GSU2874	-0,718	-1,169	-0,451
GSU2875	-1,028	-0,734	0,294
GSU2876	-0,797	-0,036	0,762
GSU2877	0,579	-0,577	-1,156
GSU2878	0,257	0,612	0,355
GSU2879	-0,421	0,007	0,427
GSU2880	0,964	0,638	-0,327
GSU2882	0,078	0,853	0,775
GSU2883	2,186	2,221	0,035
GSU2884	-0,092	-0,147	-0,055
GSU2885	-1,355	-3,354	-1,999
GSU2887	1,194	2,121	0,928

GSU2888	0,536	0,357	-0,179
GSU2889	1,419	0,334	-1,085
GSU2890	0,626	-0,317	-0,943
GSU2891	1,018	-0,241	-1,258
GSU2892	0,398	-0,218	-0,616
GSU2893	-0,343	-0,822	-0,480
GSU2894	-0,862	0,613	1,475
GSU2895	1,654	0,758	-0,896
GSU2896	1,324	1,934	0,610
GSU2898	2,452	2,074	-0,378
GSU2899	1,042	0,425	-0,617
GSU2901	-1,029	-0,385	0,644
GSU2902	2,124	-0,007	-2,131
GSU2903	0,236	0,195	-0,041
GSU2904	1,402	-0,768	-2,170
GSU2905	0,146	-1,517	-1,663
GSU2906	0,228	-0,251	-0,479
GSU2907	0,389	0,305	-0,084
GSU2908	0,319	0,113	-0,206
GSU2909	0,538	-1,281	-1,819
GSU2910	-1,193	-1,314	-0,121
GSU2911	-1,638	-1,419	0,219
GSU2912	1,943	2,497	0,554
GSU2913	0,979	1,378	0,399
GSU2914	-0,016	0,985	1,001
GSU2915	-0,315	0,540	0,855
GSU2916	0,579	-0,417	-0,996
GSU2917	0,642	-0,900	-1,542
GSU2918	-0,231	-0,147	0,084
GSU2919	-0,434	-0,259	0,175
GSU2921	0,275	-0,559	-0,833
GSU2922	-0,807	-0,110	0,697
GSU2923	-0,475	0,002	0,477
GSU2924	-0,868	2,001	2,869
GSU2925	-1,433	0,838	2,271
GSU2926	-0,559	-0,325	0,234
GSU2927	1,273	1,013	-0,261
GSU2928	0,344	-0,077	-0,422
GSU2929	1,129	0,697	-0,432
GSU2930	0,892	0,864	-0,028
GSU2932	0,846	0,133	-0,713
GSU2933	-0,464	-1,186	-0,723
GSU2934	0,686	-0,675	-1,361
GSU2935	-0,198	-0,526	-0,328
GSU2936	0,821	2,405	1,584
GSU2937	2,426	2,986	0,560
GSU2938	2,652	3,971	1,319
GSU2939	1,493	3,538	2,045
GSU2940	1,344	3,180	1,835
GSU2941	-0,496	-0,350	0,146
GSU2942	-0,042	0,230	0,272
GSU2943	0,030	0,620	0,590
GSU2944	-0,751	-0,225	0,527
GSU2945	-0,780	-1,427	-0,647
GSU2946	-1,101	-0,753	0,349
GSU2947	0,457	1,130	0,674
GSU2948	0,041	1,820	1,779
GSU2949	0,351	1,217	0,866
GSU2950	-0,061	0,420	0,481
GSU2951	-0,706	-0,945	-0,239
GSU2952	-0,381	1,394	1,775
GSU2953	0,169	1,845	1,677
GSU2954	-1,493	2,092	3,584
GSU2955	-0,540	2,292	2,832
GSU2956	-0,324	2,048	2,372
GSU2957	-0,527	1,509	2,037
GSU2958	2,441	1,780	-0,661
GSU2959	-0,797	-0,461	0,336
GSU2960	1,416	0,504	-0,912
GSU2961	1,270	0,351	-0,919
GSU2962	-0,017	0,111	0,128
GSU2963	0,758	-0,432	-1,190
GSU2964	0,357	0,916	0,559
GSU2965	-0,722	0,678	1,400
GSU2967	0,677	4,576	3,899
GSU2968	0,538	4,465	3,927
GSU2969	-1,369	0,301	1,670

GSU2970	-1,604	-0,023	1,581
GSU2971	-0,556	-0,409	0,146
GSU2973	-0,410	0,048	0,458
GSU2974	0,384	-0,756	-1,140
GSU2975	-0,627	-0,196	0,431
GSU2976	-0,575	-0,788	-0,212
GSU2977	-0,433	0,527	0,960
GSU2978	-0,355	0,985	1,341
GSU2979	-0,486	0,297	0,783
GSU2980	-1,292	-1,012	0,280
GSU2981	-0,533	-0,746	-0,213
GSU2982	0,488	-0,289	-0,777
GSU2983	-0,687	-0,965	-0,278
GSU2984	0,234	-0,443	-0,677
GSU2985	0,400	-1,172	-1,572
GSU2986	-0,935	-1,550	-0,615
GSU2987	-0,373	-1,328	-0,954
GSU2988	-0,234	-0,220	0,014
GSU2989	0,883	0,426	-0,457
GSU2990	1,144	1,454	0,310
GSU2991	1,211	0,363	-0,848
GSU2992	1,074	-0,082	-1,155
GSU2993	0,851	-0,368	-1,219
GSU2994	0,018	-1,489	-1,507
GSU2995	-0,191	-1,514	-1,323
GSU2996	-0,288	-0,241	0,047
GSU2997	-0,407	-0,299	0,108
GSU2998	1,831	0,755	-1,076
GSU2999	0,990	0,274	-0,716
GSU3000	0,280	0,240	-0,040
GSU3001	-0,295	-1,689	-1,393
GSU3002	0,664	-0,684	-1,347
GSU3003	0,301	-0,783	-1,084
GSU3004	0,721	0,251	-0,470
GSU3005	0,506	-1,427	-1,933
GSU3006	-0,132	-1,587	-1,455
GSU3007	0,034	-1,077	-1,112
GSU3008	0,279	-1,795	-2,075
GSU3009	-0,293	-0,856	-0,563
GSU3010	-2,022	-0,752	1,270
GSU3013	0,082	-1,218	-1,300
GSU3014	-1,303	1,590	2,894
GSU3015	1,984	1,986	0,002
GSU3016	1,341	0,425	-0,916
GSU3018	-0,603	1,773	2,377
GSU3019	-0,559	0,869	1,428
GSU3020	0,776	1,379	0,602
GSU3021	0,958	1,384	0,427
GSU3022	-0,659	2,053	2,712
GSU3023	-1,107	1,005	2,112
GSU3024	-0,377	1,193	1,570
GSU3025	-0,406	-0,645	-0,238
GSU3026	0,428	1,592	1,164
GSU3027	-0,119	1,826	1,945
GSU3028	-0,321	0,122	0,444
GSU3029	-1,597	-2,334	-0,737
GSU3030	-1,328	-2,365	-1,037
GSU3031	-1,223	-0,548	0,675
GSU3032	1,601	-0,107	-1,709
GSU3033	0,055	-0,962	-1,016
GSU3034	0,104	-0,325	-0,429
GSU3035	1,526	0,623	-0,903
GSU3036	-0,120	2,527	2,647
GSU3037	-0,641	2,009	2,650
GSU3038	-1,497	1,027	2,524
GSU3040	-0,710	0,004	0,714
GSU3041	-0,061	0,420	0,481
GSU3042	-0,491	1,180	1,671
GSU3043	1,546	1,525	-0,021
GSU3044	-0,034	1,470	1,504
GSU3045	-0,648	0,869	1,516
GSU3046	-0,146	2,386	2,532
GSU3047	0,875	0,246	-0,629
GSU3048	-0,853	-1,117	-0,264
GSU3050	-0,406	-0,645	-0,238
GSU3051	-1,270	-0,676	0,594
GSU3052	-1,311	-0,244	1,067

GSU3053	-1,462	-0,909	0,553
GSU3054	-1,631	-0,628	1,003
GSU3055	-0,402	-2,232	-1,830
GSU3056	-0,954	-1,925	-0,972
GSU3057	-0,660	-3,522	-2,862
GSU3058	-1,002	-2,720	-1,718
GSU3059	-0,987	-0,916	0,071
GSU3060	-1,087	-0,030	1,056
GSU3061	-0,971	-0,243	0,728
GSU3062	0,569	-0,028	-0,597
GSU3063	3,102	3,311	0,209
GSU3064	2,500	2,786	0,286
GSU3065	1,923	1,732	-0,192
GSU3066	2,156	1,644	-0,512
GSU3067	2,154	0,911	-1,243
GSU3068	1,519	1,226	-0,293
GSU3069	1,967	0,414	-1,553
GSU3070	1,412	0,378	-1,034
GSU3071	1,069	-0,696	-1,765
GSU3072	0,867	-0,039	-0,906
GSU3073	0,822	-0,928	-1,750
GSU3074	0,218	-1,800	-2,018
GSU3075	0,291	-0,727	-1,018
GSU3076	0,412	-0,175	-0,587
GSU3077	-0,108	-0,646	-0,537
GSU3078	-0,314	-0,277	0,036
GSU3079	-0,602	-1,646	-1,045
GSU3080	-0,770	-1,508	-0,739
GSU3082	NA	NA	NA
GSU3083	-0,513	-0,108	0,405
GSU3085	-1,264	-1,070	0,194
GSU3086	-0,125	-2,977	-2,852
GSU3087	-0,720	-2,890	-2,170
GSU3088	-0,646	-2,570	-1,924
GSU3089	-0,500	-1,829	-1,329
GSU3090	-0,716	-2,236	-1,520
GSU3091	-0,794	-1,009	-0,215
GSU3092	-0,545	-1,281	-0,736
GSU3093	-0,423	-0,406	0,017
GSU3094	1,019	-0,392	-1,411
GSU3095	0,967	-1,531	-2,499
GSU3096	0,553	-1,644	-2,197
GSU3097	0,507	-1,413	-1,920
GSU3098	0,525	-1,718	-2,243
GSU3099	-0,145	-2,424	-2,279
GSU3100	-0,168	-2,494	-2,327
GSU3101	-0,401	-2,807	-2,406
GSU3102	-0,617	-2,820	-2,203
GSU3103	-0,384	-2,458	-2,074
GSU3104	-0,621	-2,226	-1,605
GSU3105	-0,621	-1,245	-0,623
GSU3106	-0,857	-1,213	-0,355
GSU3107	-0,399	-0,227	0,172
GSU3108	-0,474	-0,280	0,194
GSU3109	-0,896	-1,989	-1,093
GSU3110	0,280	-2,041	-2,320
GSU3111	0,212	-1,081	-1,292
GSU3112	-0,452	-2,268	-1,815
GSU3113	-0,409	-2,004	-1,595
GSU3114	-0,705	-1,771	-1,065
GSU3115	0,111	-1,637	-1,748
GSU3116	-0,686	-2,417	-1,731
GSU3117	-0,468	0,059	0,526
GSU3118	0,044	-3,321	-3,365
GSU3119	-0,025	-3,553	-3,528
GSU3120	1,629	0,257	-1,373
GSU3121	-0,206	-0,487	-0,281
GSU3122	-0,201	-3,774	-3,574
GSU3123	-0,050	-3,515	-3,465
GSU3124	0,061	-3,522	-3,583
GSU3125	0,104	-3,640	-3,744
GSU3126	-0,154	-3,832	-3,678
GSU3127	-0,718	-3,717	-2,999
GSU3128	-0,751	-3,711	-2,959
GSU3129	-0,342	-3,520	-3,178
GSU3130	-0,562	1,010	1,572
GSU3131	-0,607	-1,075	-0,469

GSU3132	-0,812	-1,437	-0,625
GSU3133	0,088	-0,070	-0,158
GSU3134	0,181	-0,350	-0,531
GSU3135	-0,259	-1,809	-1,551
GSU3136	-0,655	-1,678	-1,023
GSU3137	-0,617	0,167	0,785
GSU3138	1,186	0,943	-0,243
GSU3139	-0,413	-0,361	0,052
GSU3140	-0,333	-0,567	-0,234
GSU3141	0,057	-0,114	-0,171
GSU3142	-0,145	-0,069	0,076
GSU3143	-1,249	0,155	1,405
GSU3144	-0,492	-0,969	-0,476
GSU3145	-0,917	-3,007	-2,090
GSU3146	-0,811	-3,218	-2,407
GSU3147	-0,874	-0,817	0,057
GSU3148	-0,508	-0,960	-0,453
GSU3150	-0,797	-0,461	0,336
GSU3151	1,224	0,877	-0,347
GSU3152	-0,982	1,058	2,040
GSU3153	-0,061	0,420	0,481
GSU3154	1,410	-0,763	-2,172
GSU3155	-0,876	0,066	0,943
GSU3156	0,463	0,229	-0,234
GSU3157	0,162	-0,670	-0,832
GSU3158	-0,124	-0,128	-0,004
GSU3159	0,640	0,123	-0,518
GSU3160	1,682	-0,277	-1,959
GSU3161	-0,437	-0,827	-0,390
GSU3162	-0,861	-0,837	0,024
GSU3163	1,033	0,442	-0,591
GSU3165	-0,533	3,461	3,995
GSU3166	1,627	3,838	2,211
GSU3167	1,406	3,329	1,924
GSU3168	-0,060	2,125	2,185
GSU3169	0,428	1,592	1,164
GSU3170	0,734	3,579	2,845
GSU3171	1,044	3,424	2,380
GSU3172	2,171	3,271	1,100
GSU3173	0,540	3,838	3,298
GSU3174	2,099	4,128	2,029
GSU3175	0,225	2,769	2,544
GSU3176	-0,151	2,089	2,239
GSU3177	0,764	2,270	1,506
GSU3180	-0,855	1,050	1,905
GSU3181	-0,681	1,163	1,845
GSU3182	0,007	1,659	1,652
GSU3183	1,682	1,123	-0,559
GSU3184	-0,783	1,045	1,828
GSU3185	-0,312	2,109	2,422
GSU3186	-0,144	1,702	1,846
GSU3187	0,566	0,684	0,118
GSU3188	0,736	0,155	-0,581
GSU3189	-0,464	-0,845	-0,381
GSU3190	0,030	-0,769	-0,799
GSU3191	0,179	-0,087	-0,266
GSU3192	-0,623	-1,312	-0,689
GSU3193	-0,092	-1,258	-1,166
GSU3194	-0,413	-1,604	-1,191
GSU3195	0,884	0,907	0,023
GSU3196	-0,609	0,776	1,385
GSU3197	-0,042	0,486	0,528
GSU3198	-0,075	0,452	0,527
GSU3199	0,718	-0,064	-0,782
GSU3200	0,971	1,690	0,719
GSU3201	-0,339	-0,261	0,078
GSU3202	-0,206	0,252	0,457
GSU3203	-0,222	-0,207	0,015
GSU3204	-0,181	0,426	0,607
GSU3205	0,250	-0,544	-0,794
GSU3206	-0,469	0,202	0,671
GSU3207	0,273	-0,113	-0,386
GSU3208	0,008	-1,088	-1,096
GSU3209	-0,237	-0,213	0,024
GSU3210	-0,345	-0,015	0,329
GSU3211	-0,240	-1,118	-0,878
GSU3212	-0,568	-1,208	-0,640

GSU3213	-0,944	-0,729	0,215
GSU3214	-0,273	2,320	2,592
GSU3215	-1,183	0,234	1,417
GSU3216	0,998	0,146	-0,852
GSU3217	-0,782	-0,725	0,057
GSU3218	-0,898	0,811	1,709
GSU3219	0,477	-0,514	-0,992
GSU3221	-0,252	1,831	2,082
GSU3222	-0,401	1,372	1,773
GSU3223	-0,892	0,432	1,323
GSU3224	-1,034	0,410	1,444
GSU3225	0,493	1,874	1,381
GSU3226	-0,224	0,608	0,832
GSU3227	-0,244	1,212	1,456
GSU3228	-0,557	0,832	1,389
GSU3229	-0,725	-3,286	-2,561
GSU3230	-0,349	-3,381	-3,032
GSU3232	0,120	1,301	1,181
GSU3233	0,233	0,824	0,591
GSU3235	-0,811	-1,936	-1,125
GSU3236	-0,693	-2,172	-1,479
GSU3238	-0,073	-1,322	-1,249
GSU3239	-0,388	-1,303	-0,915
GSU3240	-0,338	-1,306	-0,968
GSU3242	0,633	1,783	1,150
GSU3243	-0,787	-1,273	-0,486
GSU3244	-0,652	0,146	0,799
GSU3245	-0,180	-0,757	-0,577
GSU3246	-0,331	-0,113	0,218
GSU3247	0,406	1,181	0,775
GSU3248	0,390	1,454	1,064
GSU3250	-0,142	-1,219	-1,077
GSU3251	0,318	0,511	0,193
GSU3252	0,035	1,196	1,162
GSU3253	-0,725	1,394	2,119
GSU3254	1,095	1,620	0,525
GSU3255	1,668	1,929	0,261
GSU3256	1,644	2,524	0,880
GSU3257	2,404	3,155	0,752
GSU3258	1,711	1,614	-0,096
GSU3259	-0,035	2,152	2,187
GSU3260	-0,627	0,581	1,208
GSU3261	0,134	0,719	0,586
GSU3262	0,094	1,206	1,112
GSU3263	1,382	0,545	-0,837
GSU3264	2,123	1,591	-0,532
GSU3265	1,070	0,925	-0,146
GSU3266	0,502	-0,298	-0,800
GSU3267	NA	NA	NA
GSU3268	2,957	1,279	-1,678
GSU3269	0,290	0,774	0,484
GSU3270	0,428	1,592	1,164
GSU3271	1,514	0,810	-0,704
GSU3273	-0,295	-0,278	0,017
GSU3274	-0,841	-0,686	0,154
GSU3275	-0,778	-0,112	0,665
GSU3276	1,880	1,314	-0,566
GSU3277	0,247	-0,500	-0,746
GSU3278	-0,101	-0,424	-0,323
GSU3279	0,284	1,224	0,940
GSU3280	-0,435	-0,038	0,397
GSU3281	-0,468	0,220	0,688
GSU3282	-0,555	-0,921	-0,366
GSU3283	0,024	-0,245	-0,268
GSU3284	-0,238	-1,169	-0,931
GSU3285	0,425	-0,988	-1,412
GSU3286	0,038	-1,885	-1,923
GSU3287	0,434	-2,142	-2,576
GSU3288	0,898	-0,337	-1,235
GSU3289	1,555	3,465	1,910
GSU3290	0,969	2,091	1,123
GSU3291	-0,013	-1,020	-1,008
GSU3292	-0,475	2,144	2,619
GSU3293	-0,198	1,738	1,936
GSU3294	-0,090	0,917	1,008
GSU3295	-0,505	0,768	1,273
GSU3296	0,325	0,149	-0,176

GSU3297	0,487	0,116	-0,371
GSU3298	-0,609	1,048	1,657
GSU3299	0,539	2,644	2,106
GSU3300	1,102	1,618	0,516
GSU3301	0,927	0,854	-0,073
GSU3302	0,812	1,431	0,619
GSU3303	0,513	1,121	0,608
GSU3304	1,185	2,857	1,671
GSU3305	1,379	2,443	1,064
GSU3306	-0,594	0,528	1,122
GSU3307	-0,869	-1,073	-0,205
GSU3308	0,148	-0,923	-1,071
GSU3309	1,033	0,443	-0,590
GSU3310	-1,817	-0,522	1,295
GSU3311	-0,619	-1,175	-0,556
GSU3312	-0,255	0,102	0,357
GSU3313	1,338	1,154	-0,184
GSU3314	-0,282	0,150	0,432
GSU3315	0,174	-0,961	-1,135
GSU3316	0,981	1,917	0,936
GSU3317	0,205	0,881	0,676
GSU3318	0,190	-0,311	-0,501
GSU3319	-0,096	0,095	0,191
GSU3320	0,003	-1,044	-1,047
GSU3321	-0,423	-1,295	-0,872
GSU3322	0,878	0,933	0,055
GSU3323	1,855	0,807	-1,048
GSU3324	0,187	-0,150	-0,336
GSU3325	0,148	0,609	0,461
GSU3326	-0,177	-1,816	-1,639
GSU3327	-0,046	-1,557	-1,511
GSU3328	-0,251	-3,392	-3,142
GSU3329	-0,737	-3,536	-2,799
GSU3330	0,344	0,043	-0,301
GSU3331	0,519	0,099	-0,419
GSU3332	0,368	1,198	0,831
GSU3333	-0,107	0,176	0,283
GSU3334	-0,455	0,459	0,914
GSU3335	-0,121	0,567	0,688
GSU3336	-0,761	0,011	0,773
GSU3337	-0,355	-0,456	-0,101
GSU3339	-0,482	-0,732	-0,251
GSU3340	-0,662	-1,639	-0,977
GSU3341	0,894	1,951	1,056
GSU3342	1,769	2,066	0,297
GSU3343	1,552	3,022	1,470
GSU3344	2,113	3,798	1,684
GSU3345	0,431	2,700	2,268
GSU3346	0,236	1,082	0,846
GSU3347	0,603	-0,036	-0,639
GSU3348	0,199	0,306	0,107
GSU3349	-1,845	-0,108	1,737
GSU3350	0,016	0,291	0,276
GSU3351	0,123	1,403	1,280
GSU3353	-0,336	-1,111	-0,775
GSU3354	-0,256	-2,264	-2,008
GSU3356	-0,824	1,252	2,076
GSU3357	-1,081	1,376	2,457
GSU3358	-0,399	-1,930	-1,531
GSU3359	-0,494	0,034	0,528
GSU3360	0,444	-0,396	-0,841
GSU3361	-0,254	-0,848	-0,594
GSU3362	-0,062	-0,255	-0,192
GSU3363	-1,716	-1,029	0,686
GSU3364	-0,861	-2,923	-2,061
GSU3365	0,570	-1,033	-1,603
GSU3366	0,206	-0,786	-0,992
GSU3367	-0,301	-0,208	0,093
GSU3368	-0,395	-1,018	-0,623
GSU3369	-0,352	-0,124	0,228
GSU3370	1,405	3,473	2,068
GSU3371	-1,102	-0,500	0,602
GSU3372	0,390	-0,454	-0,844
GSU3373	0,341	-0,071	-0,412
GSU3374	0,473	0,147	-0,326
GSU3375	-0,016	-1,122	-1,106
GSU3376	0,308	-0,110	-0,417

GSU3377	0,304	-0,179	-0,483
GSU3378	1,195	-1,053	-2,248
GSU3379	0,007	-1,064	-1,072
GSU3380	0,099	-0,732	-0,832
GSU3381	-0,525	-0,688	-0,163
GSU3382	-0,490	-0,520	-0,030
GSU3383	-0,641	0,169	0,811
GSU3384	-0,205	-1,078	-0,873
GSU3385	-0,216	-0,404	-0,188
GSU3386	-0,908	-0,304	0,604
GSU3387	0,218	1,767	1,549
GSU3388	-0,630	-3,444	-2,814
GSU3389	1,699	1,397	-0,303
GSU3390	0,770	-0,392	-1,162
GSU3391	2,011	1,900	-0,112
GSU3392	2,239	1,682	-0,556
GSU3393	1,363	2,365	1,002
GSU3394	0,756	1,804	1,049
GSU3395	0,020	-1,994	-2,014
GSU3396	0,386	-0,779	-1,164
GSU3397	-0,193	0,230	0,423
GSU3398	0,969	0,757	-0,212
GSU3399	0,234	-0,443	-0,677
GSU3400	1,642	-0,954	-2,596
GSU3401	3,070	1,909	-1,161
GSU3402	2,851	1,532	-1,319
GSU3403	2,489	1,249	-1,240
GSU3404	1,238	0,071	-1,168
GSU3405	0,656	-0,230	-0,886
GSU3406	0,700	0,023	-0,677
GSU3407	-0,010	-0,514	-0,504
GSU3408	0,081	-0,755	-0,836
GSU3409	1,863	3,616	1,753
GSU3410	1,764	3,746	1,983
GSU3411	0,552	-0,314	-0,866
GSU3413	0,443	1,039	0,596
GSU3414	1,010	3,088	2,078
GSU3415	0,657	0,976	0,320
GSU3416	0,625	0,282	-0,343
GSU3417	1,998	1,112	-0,886
GSU3418	2,023	2,330	0,307
GSU3419	0,404	2,028	1,625
GSU3420	0,753	-0,157	-0,911
GSU3421	1,114	-0,175	-1,290
GSU3422	-0,157	-1,358	-1,201
GSU3423	-0,151	-0,584	-0,433
GSU3424	-0,155	-2,284	-2,129
GSU3425	-0,135	-0,369	-0,234
GSU3426	-0,324	2,048	2,372
GSU3427	0,493	1,874	1,381
GSU3428	2,738	2,250	-0,487
GSU3429	2,795	2,419	-0,376
GSU3430	1,523	2,403	0,880
GSU3431	1,646	0,620	-1,026
GSU3432	1,311	-0,718	-2,029
GSU3433	-1,935	-0,995	0,941
GSU3434	-1,094	-0,408	0,686
GSU3435	-0,281	0,585	0,865
GSU3436	-0,558	-0,511	0,047
GSU3437	2,447	1,454	-0,992
GSU3438	2,568	2,643	0,075
GSU3439	1,858	1,800	-0,057
GSU3440	1,508	1,497	-0,011
GSU3441	1,599	0,056	-1,543
GSU3442	1,104	1,016	-0,088
GSU3443	0,894	0,678	-0,216
GSU3444	0,126	0,321	0,195
GSU3445	0,576	0,084	-0,492
GSU3446	-0,196	-1,933	-1,737
GSU3447	-0,525	-0,862	-0,337
GSU3448	1,290	0,956	-0,335
GSU3449	-0,787	1,412	2,199
GSU3450	-0,038	0,075	0,112
GSU3451	-0,267	-1,261	-0,994
GSU3452	-0,033	-0,462	-0,429
GSU3453	0,030	-0,757	-0,788
GSU3454	-0,372	-0,147	0,224

GSU3455	0,135	-1,540	-1,675
GSU3456	-0,282	-1,055	-0,772
GSU3457	-0,406	-0,524	-0,119
GSU3459	-1,561	-1,554	0,007
GSU3460	-1,050	-1,867	-0,817
GSU3461	-0,226	-1,633	-1,406
GSU3462	-0,006	-1,035	-1,029
GSU3463	-0,465	-3,148	-2,683
GSU3464	-0,292	-2,249	-1,957
GSU3465	-0,698	-2,282	-1,583
GSU3466	-0,997	-1,812	-0,815
GSU3467	-1,125	-1,156	-0,031
GSU3468	-0,978	-2,813	-1,835
GSU3469	-0,721	-2,008	-1,288
GSU3472	-0,290	0,988	1,278
GSU3473	-1,319	-0,228	1,091
GSU3474	3,566	1,562	-2,004
GSU3475	-0,702	0,723	1,425
GSU3477	-0,846	-0,992	-0,145
GSU3478	0,168	3,538	3,370
GSU3479	0,188	1,585	1,396
GSU3482	-0,224	0,608	0,832
GSU3483	0,447	0,514	0,066
GSU3484	-1,440	0,234	1,674
GSU3485	-0,348	-0,326	0,021
GSU3486	0,158	1,338	1,181
GSU3487	0,164	1,477	1,313
GSU3488	1,416	0,504	-0,912
GSU3489	2,324	4,010	1,686
GSU3490	-0,417	0,366	0,782
GSU3491	-1,270	-0,676	0,594
GSU3492	2,426	1,114	-1,311
GSU3493	-0,765	0,005	0,770
GSU3494	-1,982	-0,367	1,615
GSU3495	-0,519	2,033	2,552
GSU3496	-0,666	-0,298	0,368
GSU3497	-0,904	1,148	2,052
GSU3498	-0,117	0,635	0,751
GSU3500	-0,876	0,066	0,943
GSU3502	0,719	1,337	0,619
GSU3503	2,217	3,514	1,297
GSU3504	1,527	1,938	0,410
GSU3505	-1,272	-1,626	-0,354
GSU3506	-2,727	0,339	3,066
GSU3507	1,091	2,595	1,504
GSU3508	-1,419	-1,811	-0,393
GSU3509	-1,050	-1,331	-0,281
GSU3510	1,174	0,235	-0,938
GSU3511	-0,465	0,161	0,626
GSU3513	-1,683	-0,009	1,674
GSU3514	-0,837	-0,328	0,509
GSU3515	-1,173	-0,338	0,835
GSU3518	-1,289	-1,683	-0,395
GSU3519	-0,893	-0,897	-0,004
GSU3520	1,947	3,040	1,092
GSU3521	-0,743	1,260	2,003
GSU3522	0,428	1,592	1,164
GSU3524	-0,413	-1,617	-1,205
GSU3526	1,455	1,339	-0,116
GSU3527	-0,406	-0,645	-0,238
GSU3529	-0,331	-0,399	-0,068
GSU3530	-0,342	0,622	0,964
GSU3533	-1,541	0,715	2,256
GSU3536	0,319	-0,339	-0,658
GSU3538	-0,290	0,988	1,278
GSU3539	0,674	2,666	1,992
GSU3540	-0,349	-0,222	0,127
GSU3541	-0,038	1,375	1,414
GSU3542	-0,783	2,240	3,023
GSU3543	-0,261	-0,637	-0,377
GSU3545	-0,109	0,369	0,477
GSU3546	-1,187	-0,116	1,071
GSU3547	-0,238	1,217	1,455
GSU3548	0,859	3,468	2,609
GSU3549	0,074	-1,580	-1,654
GSU3550	NA	NA	NA
GSU3551	0,376	2,416	2,040

GSU3552	-0,144	0,951	1,095
GSU3553	-0,042	-0,909	-0,868
GSU3554	1,120	2,451	1,331
GSU3555	-0,061	0,420	0,481
GSU3556	-0,406	-0,645	-0,238
GSU3557	-0,105	-0,256	-0,152
GSU3559	0,548	2,095	1,547
GSU3560	-0,703	3,126	3,829
GSU3561	-1,194	-0,361	0,834
GSU3562	-0,323	1,851	2,174
GSU3563	-0,730	0,897	1,627
GSU3564	-1,359	1,491	2,850
GSU3565	-1,116	-0,490	0,626
GSU3566	1,261	-0,136	-1,396
GSU3567	1,036	-0,251	-1,287
GSU3571	0,538	3,858	3,319
GSU3572	2,398	1,143	-1,256
GSU3573	1,646	0,269	-1,377
GSU3575	-0,805	-0,613	0,193
GSU3576	1,085	0,016	-1,069
GSU3578	0,502	1,138	0,636
GSU3579	-0,335	1,285	1,619
GSU3580	-0,244	0,043	0,287
GSU3581	0,397	2,521	2,124
GSU3582	2,370	1,898	-0,472
GSU3583	0,288	-0,164	-0,451
GSU3584	0,966	0,966	0,000
GSU3586	-1,065	-1,727	-0,662
GSU3587	-0,061	0,420	0,481
GSU3588	0,113	1,633	1,520
GSU3589	-0,540	2,866	3,406
GSU3590	0,445	2,776	2,330
GSU3592	1,423	1,618	0,195
GSU3593	1,685	2,469	0,784
GSU3594	-0,413	1,006	1,419
GSU3595	0,943	1,199	0,255
GSU3596	1,595	2,036	0,441
GSU3597	-0,457	0,783	1,240
GSU3598	NA	NA	NA
GSU3600	-0,417	0,366	0,782
GSU3601	0,573	1,142	0,570
GSU3602	-0,533	-0,746	-0,213
GSU3603	-0,117	1,171	1,287
GSU3604	0,082	-1,529	-1,611
GSU3605	2,087	-0,979	-3,066
GSU3606	2,249	0,913	-1,335
GSU3608	0,204	-0,521	-0,726
GSU3609	0,210	0,561	0,351
GSU3610	NA	NA	NA
GSU3611	-0,420	-0,272	0,148
GSU3612	-0,734	-0,640	0,093
GSU3614	-0,205	-0,753	-0,548
GSU3615	1,853	1,621	-0,232
GSU3616	0,007	1,659	1,652
GSU3617	0,864	-0,879	-1,743
GSU3619	-0,645	-0,196	0,448
GSU3620	0,605	1,120	0,515
GSU3621	-0,256	-0,712	-0,456
GSU3624	0,562	2,299	1,737
GSU3625	0,787	1,935	1,148
GSU3626	-0,049	-1,202	-1,153
GSU3627	0,579	0,227	-0,352
GSU3628	0,304	0,725	0,420
GSU3629	1,704	3,083	1,379
GSU3630	-0,333	-3,741	-3,408

Tabelle 45: Daten der Metatranskriptomanalyse aus dem Vergleich des Durchfluss-Experiments mit 51 Proteinsequenzen ausgewählter (Schlüssel-)Enzyme. Gene mit den absoluten Reads und den reads per million (RPM).

Gene	absolut	RPM
gi 1014451750 gb KYV45769.1  TMAO reductase [ <i>Escherichia coli</i> ]	284	83
gi 1024797169 gb ANC26053.1  pyruvate formate-lyase protein Pfl [ <i>Streptococcus pyogenes</i> ]	17446	5124
gi 115512243 gb ABJ00318.1  gpD [ <i>Escherichia coli</i> APEC O1]	526	154
gi 160624920 gb ABO42543.2  hydrogenase [ <i>Clostridium</i> <i>butyricum</i> ]	1253	368
gi 190909529 gb EDV69114.1  acetate kinase [ <i>Escherichia</i> <i>coli</i> F11]	1328	390
gi 24371766 ref NP_715808.1  T2aSS secretion system secretin GspD [ <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1]	10317	3030
gi 24371768 ref NP_715810.1  T2aSS secretion system inner membrane platform protein GspF [ <i>Shewanella</i> <i>oneidensis</i> MR-1]	1290	379
gi 24373342 ref NP_717385.1  extracellular iron oxide respiratory system outer membrane component MtrB [ <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1]	870	256
gi 24373343 ref NP_717386.1  extracelllular iron oxide respiratory system periplasmic decaheme cytochrome c component MtrA [ <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1]	311	91
gi 24373344 ref NP_717387.1  extracellular iron oxide respiratory system surface decaheme cytochrome c component MtrC [ <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1]	394	116
gi 24373345 ref NP_717388.1  extracelllular iron oxide respiratory system surface decaheme cytochrome c component OmcA [ <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1]	2102	617
gi 24376064 ref NP_720107.1  membrane anchored tetraheme cytochrome c CymA [ <i>Shewanella oneidensis</i> MR- 1]	172	51
gi 255508068 gb EET84489.1  Glycine reductase [ <i>Clostridium carboxidivorans</i> P7]	471	138
gi 298504737 gb ADI83460.1  cytochrome c, 4 heme-binding sites [ <i>Geobacter sulfurreducens</i> KN400]	9279	2725
gi 298505609 gb ADI84332.1  type IV pilus inner membrane protein PilC [ <i>Geobacter sulfurreducens</i> KN400]	7412	2177
gi 298506139 gb ADI84862.1  type IV pilus secretin	3919	1151

lipoprotein PilQ [ <i>Geobacter sulfurreducens</i> KN400]		
gi 300437026 gb ADK16793.1  carbon monoxide dehydrogenase [ <i>Clostridium ljungdahlii</i> DSM 13528]	2856	839
gi 305856304 gb ADM68092.1  phosphoketolase [ <i>Paenibacillus polymyxa</i> E681]	2041	599
gi 307635043 gb ADI85261.2  cytochrome c, 6 heme-binding sites [ <i>Geobacter sulfurreducens</i> KN400]	1369	402
gi 308066779 gb ADO12091.1  CO dehydrogenase/acetyl-CoA synthase, acetyl-CoA synthase subunit [ <i>Clostridium carboxidivorans</i> P7]	1040	305
gi 308825013 emb CBH21051.1  Arginine deiminase (ADI) (Arginine dihydrolase) (AD) [ <i>Clostridium sticklandii</i> ]	416	122
gi 336299116 gb AEI42219.1  Ldh [ <i>Paenibacillus mucilaginosus</i> KNP414]	1221527	358753
gi 341920839 gb EGT70444.1  acs [ <i>Escherichia coli</i> O104:H4 str. G227-11]	1487	437
gi 573579109 gb ETT77465.1  cellobiose phosphorylase [ <i>Paenibacillus</i> sp. FSL R7-277]	2472	726
gi 612260286 gb EZQ53944.1  DMSO reductase [ <i>Escherichia coli</i> O157: str. 2010EL-2044]	772103	226761
gi 723449164 gb KHD15274.1  xanthine dehydrogenase [ <i>Clostridium butyricum</i> ]	2707	795
gi 731158483 emb CEK37518.1  Glycine decarboxylase [ <i>Clostridium sordellii</i> ]	943	277
gi 738695293 ref WP_036594467.1  phosphate acetyltransferase [ <i>Paenibacillus sophorae</i> ]	1049	308
gi 751401542 gb AJF77627.1  phosphotransacetylase [ <i>Escherichia coli</i> ]	643	189
gi 751402387 gb AJF78472.1  nitrite reductase [ <i>Escherichia coli</i> ]	8082	2374
gi 751403183 gb AJF79268.1  fumarate reductase [ <i>Escherichia coli</i> ]	957	281
gi 75361391 sp Q5U923.1 HADC_PEPDI RecName: Full=(R)-2-hydroxyisocaproyl-CoA dehydratase beta subunit	687	202
gi 75361392 sp Q5U924.1 HADB_PEPDI RecName: Full=(R)-2-hydroxyisocaproyl-CoA dehydratase alpha subunit	14977	4399
gi 75361393 sp Q5U925.1 HADI_PEPDI RecName: Full=2-hydroxyisocaproyl-CoA dehydratase activator	729	214
gi 75406927 sp Q93AL8.1 FLDC_CLOSG RecName: Full=R-phenyllactate dehydratase beta subunit	535	157
gi 75406928 sp Q93AL9.1 FLDB_CLOSG RecName:	532	156

Full=R-phenyllactate dehydratase subunit alpha; Flags: Precursor		
gi 764109986 gb KJD38897.1  butanol dehydrogenase [ <i>Paenibacillus polymyxa</i> ]	302	89
gi 764112575 gb KJD41464.1  alpha-acetolactate decarboxylase [ <i>Paenibacillus polymyxa</i> ]	253	74
gi 764112765 gb KJD41652.1  acetate kinase [ <i>Paenibacillus polymyxa</i> ]	2473	726
gi 769364136 gb KJJ75076.1  aminomethyltransferase [ <i>Clostridium</i> sp. FS41]	467	137
gi 800899476 gb AKA71660.1  D-proline reductase [ <i>Clostridium scatologenes</i> ]	57410	16861
gi 85676144 dbj BAE77394.1  6-phosphofruktokinase I [ <i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. W3110]	3270	960
gi 917007469 ref WP_051614181.1  acetolactate synthase [ <i>Paenibacillus</i> sp. UNC217MF]	32958	9680
gi 923387097 gb KOR25956.1  pyruvate ferredoxin oxidoreductase [ <i>Clostridium</i> sp. L74]	3322	976
gi 930359049 gb ALF47236.1  formate dehydrogenase H, selenocysteine-containing [ <i>Campylobacter concisus</i> ]	1172268	344286
gi 937299854 gb ALH90698.1  nitrate reductase [ <i>Escherichia coli</i> O157:H7]	15816	4645
gi 937300747 gb ALH91591.1  NADH dehydrogenase [ <i>Escherichia coli</i> O157:H7]	772	227
gi 941132041 ref WP_055069142.1  pyruvate decarboxylase [ <i>Clostridium</i> sp. ND2]	2048	601
gi 953087628 gb KRU12878.1  formate dehydrogenase, alpha subunit [ <i>Clostridium pasteurianum</i> DSM 525 = ATCC 6013]	12521	3677
gi 974705824 emb CUW79728.1  L-lactate dehydrogenase [ <i>Escherichia coli</i> ]	2638	775
WP_016206284.1 cellulase [ <i>Clostridium sartagoforme</i> ]	3878	1139