

Abreinigung cellulosehaltiger Biomasse unter Generierung elektrischer Energie und Acetoin

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

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

genehmigte

DISSERTATION

von

Cornelia Tina Klessing

aus

Rochlitz

Dekan: Professor Dr. Reinhard Fischer
Referent: Professor Dr. Johannes Gescher
Korreferent: Professor Dr. Harald Horn
Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2018



Dieses Werk ist lizenziert unter einer Creative Commons Namensnennung - Nicht kommerziell - Keine Bearbeitungen 4.0 International Lizenz. (CC BY-NC-ND 4.0 DE):

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed>.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Johannes für das Vertrauen bedanken, dass du mir mit der Überlassung dieses Projekts geschenkt hast. Danke auch für die Erfahrungen, die ich im Gescher-Lab die letzten (fast) fünf Jahre, einschließlich der Masterarbeit, sammeln durfte. Danke für diese Herausforderung! Danke für deine Zeit, deine Geduld und deine Energie den wilden Haufen immer wieder ins richtige Fahrwasser zu bringen!

Ich möchte mich bei dem gesamten Labor für die Zeit bedanken. Fredi, der mich zu allererst als F3-Praktikantin angenommen hat und dann meine helfende Hand während der Masterarbeit wurde. Sebastian, danke, dass du immer ein offenes Ohr hast und hattest, auch bei den blödesten Fragen! Danke Büro 1, das Mädelsbüro mit Tobi ☺ Danke, für jeden Kaffeeklatsch, für Brezeltastings, für jedes aufbauende, tadelnde, motivierende, aufmunternde, zum Lächeln oder manchmal auch zur Rührung bringende Wort und all die Überraschungseier. Danke für eure Zeit und für eure Korrekturen! Ihr seid nicht nur Kolleginnen! Danke France für deine Zeit als mein Post-Dok! Thea, Tobi und Ferdi danke für Süßees! Danke Sibylle für Auszeitgespräche! Danke Anne&Vicky (Büro 4 & Lucas) für alle Ganggespräche und dass ich im letzten Jahr öfter mit euch Quatschen konnte!

Auch bei allen anderen möchte ich mich für die gute Arbeitsatmosphäre bedanken! Ich hoffe, in der Arbeitsgruppe erhält sich die freundschaftliche Atmosphäre! Ein Danke geht an alle, die mir diesen Weg und diese Arbeit ermöglicht haben!

Außerdem möchte ich mich bei meinen Bachelorstudenten und allen Praktikanten bedanken, die nicht nur fachlich lehrreich waren. Danke an alle HiWis und jede helfende Hand.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei den wichtigsten Menschen in meinem Leben bedanken. Danke Mama und Papa! Für ALLES! Ohne euch wäre so vieles nicht möglich gewesen, vor allem aber keine Kommasetzung. Danke Vincent, vor allem für deine aufbauenden Worte und deine grenzenlose Ehrlichkeit ☺ Danke Manuel! Danke, dass du für mich da bist, einkaufst, Sätze wieder entknotest und für so viel mehr. Danke Julia, für jedes-in-den-Arsch-treten, für ehrliche Motivation, Gifs und Toni-Abende! Danke Omi, Anja, Jule, Lilly, Micha, Michael, Elisabeth,...

Vielen Dank!

Erklärung an Eides statt

Hiermit versichere ich, dass ich die folgende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Alle wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Texten entnommenen Stellen habe ich als solche durch Nennung der Quellen 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 Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Februar 2015 bis August 2018 am Institut für Angewandte Biologie der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften des Karlsruher Instituts für Technologie unter der Leitung von Professor Dr. Johannes Gescher durchgeführt.

Karlsruhe, den

Cornelia Tina Klessing

Publikationsliste

Efficient Bioelectrochemical Conversion of Industrial Wastewater by Specific Strain Isolation and Community Adaptation, Brunner S., Klessing T., Dötsch A., Gescher J., 2019, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*; DOI:10.3389/fbioe.2019.00023

Live imaging of Xwnt5A-ROR2 complexes, Wallkamm V., Dörlich R., Rahm K., Klessing T., Nienhaus G., Wedlich D., Gradl D., 2014; *PLoS One*; DOI:10.1371/journal.pone.0109428

Vorträge und Konferenzbeiträge

Vortrag auf der Jahrestagung der *Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie* (VAAM) in Würzburg/Deutschland, 2018.

Titel: *Establishing a technology platform for the conversion of waste to platform chemicals and electrical energy.*

Posterpräsentation auf der Jahrestagung der *Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie* (VAAM) in Würzburg/Deutschland, 2017.

Titel: *Conversion of biomass from waste to platform chemicals.*

Posterpräsentation auf der 25. European Biomass Conference & Exhibition (EUBCE) in Stockholm/Schweden, Juni 2017.

Titel: *Establishing a value chain for production of a platform chemical and current out of paper towels.*

Posterpräsentation Trilaterales BES-Meeting in Karlsruhe/Deutschland am 06.02.2017.

Titel: *Establishing a value chain for production of a platform chemical and current out of paper towels.*

Zusammenfassung

Einen Abfallstoff zu recyceln ist in den meisten Fällen sinnvoller, als ihn zu entsorgen und im Anschluss zu verbrennen. Aus biotechnologischer Sicht steckt in den meisten organischen Kohlenstoffverbindungen ein Substrat für Mikroorganismen und genug chemische Energie, um einen nutzbareren Stoff daraus zu generieren. Solche Verbindungen zu verbrennen kann allenfalls zu einer Nutzbarmachung der beinhalteten Energie in Form von Wärmeenergie führen. Enthaltene Moleküle, wie Kohlenstoffe werden dann z.B. als CO_2 freigesetzt und gehen nicht nur dem Stoffkreislauf verloren, sondern belasten im schlimmsten Fall zusätzlich die Umwelt. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Kaskadennutzung charakterisiert, in der ein cellulosehaltiger Abfallstoff schrittweise um- oder abgebaut werden kann und dadurch Strom und eine Plattformchemikalie, hier Acetoin, generiert werden können.

Die cellulosehaltigen Toiletten- und Handtuchpapiere konnten, im Gegensatz zu Holzpellets, durch das verwendete Abwasserkonsortium zur Produktion von organischen Säuren genutzt werden. Unter N_2 -Atmosphäre und 30°C veränderte sich das eingesetzte Konsortium in den Fermentationsansätzen über die Zeit. Die anfänglich von Bacteroidales dominierten Versuche wurden durch Vertreter der Clostridiales ersetzt. Zudem konnten sich Methanobacteriales an die Bedingungen adaptieren. In den ersten Versuchen konnte das Produktspektrum durch den pH-Wert gesteuert werden. Die Fermentationen bei pH 6 zeigten mehr Propionat und Butyrat, wohingegen bei pH 7 mehr Acetat gemessen wurde. In den Ansätzen mit pH 6 konnte mit 99% das größte Verhältnis von C_{VFA} zu C_{TOC} gemessen werden, sodass alle gelösten Kohlenstoffe in den detektierten organischen Säuren (VFA) gebunden waren. Bei pH 7 war jedoch die Konzentration an organischen Säuren am größten. Durch den Einsatz von H_2/CO_2 , statt N_2 als Gasphase, wurde weniger Acetat hergestellt. Jedoch wurde dabei auch Methan produziert und Kohlendioxid verbraucht.

Das produzierte Fermentat enthielt keine exoelektrogenen Organismen, welche die VFA unter Stromproduktion abbauen konnten. Daher wurde ein Perkolatkonsortium und *Geobacter sulfurreducens* mit sterilem Fermentat charakterisiert. Durch das Perkolatkonsortium konnten wahlweise Acetat und Butyrat oder alle drei VFA abgebaut werden. Dabei wurde eine mittlere Stromdichte von $320 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ gemessen, wodurch sich eine Coulomb-Effizienz von 6% ergab. Mit *G. sulfurreducens* wurde Acetat mit einer mittleren Stromdichte von $200 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ und einer

CE von 42% aus dem Fermentat abgebaut. Für das so abgereinigte Fermentat wurde gezeigt, dass das verbliebene Propionat durch Nanofiltration mit den Membranen NF90 und NF270 zu 82% bzw. 84% zurückgehalten werden kann.

Generell wurde gezeigt, dass das Fermentat sowohl aerob für *Shewanella oneidensis* und *Escherichia coli*, als auch anaerob für *Geobacter sulfurreducens* als Kultivierungsflüssigkeit dienen kann. Aerob wurde durch Hefeextraktzugabe das Wachstum erhöht. Für den modifizierten *S. oneidensis*-Stamm (#1039; Δ ackA Δ pta mit pBAD_alsSD) konnte innerhalb von 24 h kein VFA-Abbau festgestellt werden. Daneben wurde *E. coli* K12 an Propionat und Butyrat als Substrat adaptiert und dadurch sowohl das Wachstum, als auch der Abbau der VFA gesteigert. Die Adaption kann durch Kultivierung ohne Propionat dabei wieder rückgängig gemacht werden.

In *E. coli* K12 wurde die 3'-5'-Exoribonuklease RNase R identifiziert, für die eine posttranskriptionelle Regulation des *prp*-Operons gezeigt wurde. Durch deren Aktivität wird der Abbau von Propionat gehemmt. Mit der K12 Δ rnr-Delentionsmutante konnte auch in dieser Arbeit ohne Adaption ein besseres Wachstum und eine gesteigerte Abbaurate von Propionat gegenüber des K12 Wildtyps gezeigt werden. In M9-Medium zeigten die Stämme K12 Δ rnr und K12 Wildtyp mit dem Plasmid pMal_alsSD eine maximale Ausbeute von 84% bzw. 62% Acetoin aus Propionat. Vor allem das Wachstum des Stamms K12 Δ rnr wurde durch Butyrat im Medium, auch als Kosubstrat für Propionat, gehemmt. Im Gegensatz zum Wildtyp konnte die Deletionsmutante Butyrat nicht abbauen. Beide transformierten Stämme zeigten kein Wachstum auf Butyrat als alleiniges Substrat.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Erklärung an Eides statt	II
Publikationsliste.....	III
Vorträge und Konferenzbeiträge.....	III
Zusammenfassung.....	IV
Abkürzungsverzeichnis	XI
1. Einleitung.....	1
1.1. Biomassen und deren Verwendung in Deutschland	1
1.1.1. Energetische Nutzung.....	1
1.2. Papier	3
1.2.1. Herstellung und Zusammensetzung.....	4
1.2.2. Cellulose	5
1.2.3. Mikrobielle Nutzung cellulosehaltiger Biomassen	5
1.3. Metabolismus organischer Säuren	8
1.3.1. Synthesewege für Propionat	8
1.3.2. Abbau organischer Fettsäuren	10
1.3.3. Propionsäure als Substrat.....	12
1.4. Elektrochemische Systeme.....	15
1.4.1. Bioelektrochemische Systeme (BES)	16
1.4.2. Mikrobielle Brennstoffzelle (MFC)	18
1.4.3. Weitere BES	19
1.5. Extrazellulärer Elektronentransport (EE).....	20
1.5.1. Direkter Elektronentransfer	23
1.5.2. Elektronentransport und Stoffwechselforgänge in <i>G. sulfurreducens</i>	24
1.5.3. Bakterien in BES.....	26
1.5.4. Abwasser als Substrat in BES.....	27
1.6. Ziel der Arbeit.....	28
2. Material und Methoden	30
2.1. Material	30
2.1.1. Abwasser und Biomasse	30

2.1.2.	Bakterienstämme	30
2.1.3	Software, Datenbanken.....	31
2.1.3.	Chemikalien, Enzyme, Reagenzien und Kits	32
2.1.4.	Primer	32
2.1.5.	Sonden.....	33
2.1.6.	M3C-Bioelektrochemisches System (3-Elektroden-Messprinzip)	33
2.2.	Methoden	37
2.2.1.	Kulturmedien.....	37
2.2.2.	Herstellung von Kryokulturen	46
2.2.3.	Aufbau der Papierfermentation	46
2.2.4.	Bioelektrochemisches System (M3C)	48
2.2.5.	Berechnung der Coulomb-Effizienz.....	49
2.2.6.	Berechnung des Kohlenstoffgehalts der Gasphase.....	50
2.2.7.	Crossflow Filtration und Nanofiltration.....	51
2.2.8.	Produktion von Plattformchemikalien	52
2.2.9.	Molekularbiologische Methoden	54
2.2.10.	Analytische Methoden	63
2.2.11.	Sequenzierung und Bioinformatische Analyse.....	67
3.	Ergebnisse.....	70
3.1.	Fermentation	70
3.1.1.	250 ml Fermentation von Toilettenpapier und Holzpellets	70
3.1.2.	Fermentationsansatz 1 L Papierhandtücher	75
3.1.3.	Fermentation in 2 L mit Papierhandtüchern	77
3.1.4.	Einfluss der Gasphase.....	78
3.1.5.	16S Amplikon Analyse mittels IlluminaSeq®	85
3.2.	Abreinigungsschritt im BES	90
3.2.1.	Amperometrie und OCP des Perkolatkonsortiums mit Fermentat	92
3.2.2.	Abbau von Fermentat mit <i>Geobacter sulfurreducens</i>	96
3.3.	Nanofiltration.....	100

3.4. Fermentat als Substrat.....	102
3.4.1. Wachstum von <i>Shewanella oneidensis</i> und <i>Geobacter sulfurreducens</i>	102
3.4.2. Effizienzsteigerung der Produktion von Acetoin aus Propionat mit <i>Escherichia coli</i> ..	105
4. Diskussion.....	113
4.1. Fermentation	113
4.1.1. Einfluss des pH-Werts.....	113
4.1.2. Einfluss der Gasphasen N ₂ und H ₂ /CO ₂	117
4.1.3. Mikrobielle Zusammensetzung	120
4.2. Abbau der organischen Säuren unter Stromproduktion	127
4.3. Nanofiltration.....	130
4.4. Fermentat als Kultivierungsmedium zur Produktion von Acetoin	131
5. Ausblick	140
6. Referenzen.....	142
Anhang	159

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Bruttostromerzeugung in Deutschland 2017.....	3
Abbildung 2: Anaerober Lignocelluloseabbau..	7
Abbildung 3: Produktionswege für Propionat.....	10
Abbildung 4: Schema der β -Oxidation zum Abbau von Fettsäuren.....	12
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Propionat-Abbauwegs in <i>E. coli</i>	14
Abbildung 6: Allgemeiner Aufbau eines Elektrochemischen Systems bzw. einer Brennstoffzelle.....	16
Abbildung 7: Aufbau einer mikrobiellen Brennstoffzelle (MFC).....	18
Abbildung 8: Schema der mikrobiellen Elektrolysezelle und der mikrobiellen Elektrosynthesezelle ..	20
Abbildung 9: Schema der extrazellulären Elektronentransfer-Mechanismen.....	23
Abbildung 10: Schema der Atmung in <i>G. sulfurreducens</i>	26
Abbildung 11: Aufbau der bioelektrochemischen Zelle.....	36
Abbildung 12: Aufbau der Fermentation in laborüblichen Schottflaschen mit Anaerobverschluss.....	47
Abbildung 13: Konzentration organischer Säuren der Biomassen Holzpellet und Toilettenpapier	72
Abbildung 14: Kohlenstoffgehalt der Flüssigphase der Fermentation mit Toilettenpapier.	73
Abbildung 15: Verteilung organischer Säuren der Fermentation mit Papierhandtüchern.....	76
Abbildung 16: Verteilung organischer Säuren der Fermentation mit Handtuchpapier in 2 Litern.....	78
Abbildung 17: Der Einfluss der Gasphasen H_2/CO_2 (80%/20%) und N_2 (100%) auf die Produktion organischer Säuren.....	80
Abbildung 18: Gasverteilung der Ansätze unter den Gasphasen H_2/CO_2 und N_2 bei pH 6 und 7.....	82
Abbildung 19: Exemplarische Bilder der FISH zur Detektion von Bakterien und Archaea.....	84
Abbildung 20: Verteilung der Bakterienordnungen der Fermentation von Holzpellets und Toilettenpapier.....	86
Abbildung 21: Verteilung der identifizierten Bakterienordnungen unter verschiedenen Gaseinflüssen gegenüber dem Inokulum.....	88
Abbildung 22: Gelbild der iproof-PCR zur Detektion von Pilz-DNA.....	90
Abbildung 23: Stromdichte für die Versuche mit sterilem und unsterilem Fermentat.....	91
Abbildung 24: Exemplarische Kurve einer mittleren Stromdichte für die Vorinkubationen der Anoden mit Perkolat. Die Standardabweichung wird in grau dargestellt.....	93
Abbildung 25: Potential des <i>open circuit potential</i> -Laufs und mittlere Stromdichte eines Amperometrie-Experiments (B) mit Fermentat und Percolat-Konsortium. (A) OCP: Über 17 Tage pendelte sich das Potential bei etwa -320 mV ein. (B) Amperometrie: Das Potential wurde auf -191 mV gegen Ag/AgCl gesetzt. Die Standardabweichungen wird in grau gezeigt.....	94
Abbildung 26: Abbau der organischen Säuren aus Fermentat im Amperometrie- und OCP-Modus... ..	94
Abbildung 27: Stromproduktion des Perkolat-Konsortiums mit sterilem Fermentat und 50 μ M BrES. 96	
Abbildung 28: Abbau von organischen Säuren und Stromproduktion mit <i>Geobacter sulfurreducens</i> . 97	
Abbildung 29: Acetatabbau in Fermentat unter Stromproduktion mit <i>G. sulfurreducens</i>	99
Abbildung 31: Wachstum von <i>Shewanella oneidensis</i> #1039 in PBS und Fermentat \pm 0,1% Hefe.....	104
Abbildung 32: Wachstum, Verdopplungszeit und Abbauraten der Adaptionsexperimente von <i>E. coli</i> K12.....	106
Abbildung 33: Wachstumskurven und Abbau der organischen Säuren in der 5. Adaptionsgeneration des <i>E. coli</i> K12 in M9-Medium.....	107
Abbildung 34: <i>Escherichia coli</i> K12 nach der 6. Überführung.....	108
Abbildung 35: Wachstumskurven des <i>E. coli</i> K12 Wildtyp und Δ nr jeweils mit pMal_alsSD.	110

Abbildung 36: Das Wachstum von K12 Wildtyp_pMal_alsSD und K12 Δrnr -pMal_alsSD auf Propionat, Butyrat oder beiden organischen Säuren..... 111

Abbildung 37: Vereinfachte Darstellung von VFA-Produktionswegen einer Glucose- oder Cellulosefermentation..... 118

Abkürzungsverzeichnis

Neben den Standard Abkürzungen für SI-Einheiten wurden folgende genutzt:

Ag/AgCl	Silber/Silberchlorid-Referenzelektrode
BES	bioelektrochemisches System
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
CE	Coulomb-Effizienz
CSB	chemischer Sauerstoffbedarf
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
e-	Elektronen
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
(μ)GC	(Mikro) Gaschromatographie
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
MFC	engl. <i>microbial fuel cell</i> ; mikrobielle Brennstoffzelle
MO	Mikroorganismen
OD	optische Dichte
OTU	operational taxonomic unit
RT	Raumtemperatur
SHE	<i>standard hydrogen electrode</i> = Standard Wasserstoffelektrode
TC	totaler (gesamter) Kohlenstoff
TCA	Citratzyklus
TIC	gesamter inorganischer Kohlenstoff
TN	gesamter gebundener Stickstoff
TOC	gesamter organischer Kohlenstoff
wt	Wildtyp
ÜN	über Nacht
Δ	Deletion

1. Einleitung

1.1. Biomassen und deren Verwendung in Deutschland

Die Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe (FNR, ein Projektträger des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft) subsumiert unter dem Begriff Biomasse alle organischen, regenerierbaren Massen, die in einem überschaubaren Zeitraum wieder nachwachsen oder ersetzt werden können. Energie ist in der Biomasse in Form von Zucker, Stärke und Cellulose (Kohlenhydrate), Ölen, Fetten und Proteinen gespeichert. Diese nutzbare Energie stammt indirekt über die Photosynthese aus der Sonnenenergie und stellt daher eine theoretisch unerschöpfliche Quelle dar. Der Vorteil der Nutzung solcher Stoffe, ist die CO₂-Neutralität auf stofflicher Ebene, wenn die Lagerung, der Transport und die Verarbeitung nicht mit eingerechnet werden. Das durch die Nutzung der Biomasse freiwerdende CO₂ wurde zuvor während des Wachstums der Pflanzen gespeichert. Diese Bilanz kann noch gesteigert werden, wenn recycelte Biomasse oder Abfallstoffe eingesetzt werden. Ungenutzt wird durch Verrottung der Biomasse der gleiche Teil CO₂ frei.

1.1.1. Energetische Nutzung

Bis 2050 soll der elektrische Energiebedarf in Deutschland nur noch aus erneuerbaren Energien gedeckt werden. Neben einer Halbierung des gesamten Bedarfs muss dafür die Nachhaltigkeit und das Spektrum der Energieressourcen vergrößert werden. Als Teil der erneuerbaren Energien soll ebenfalls der Anteil der Bioenergie verdoppelt werden. Für die Bioenergie werden entweder Abfallbiomassen (z.B. aus der Holzindustrie oder Ernteabfälle genutzt) oder speziell dafür gezüchtete Energiepflanzen benutzt. Der Wirkungsgrad und die Energiebilanz sind dafür je nach Nutzungsart und Zusammensetzung der Biomasse sehr unterschiedlich. In Deutschland liegt das Potential von Abfallstoffen laut FNR bei etwa $500 \cdot 10^{15}$ J pro Jahr, das entspricht einem Bioenergieanteil von 50% der regenerativen Energie Quellen, wobei die Bioenergie ca. 7,5% der Gesamtenergie pro Jahr ausmacht. Jedoch wird ebenfalls davon ausgegangen, dass fast die gleiche Menge (ca. $448 \cdot 10^{15}$ J) nicht genutzt wird. Dabei handelt es sich größtenteils um Wald- und Landschaftsrestholz und Stroh, aber auch um Gülle und Siedlungsabfälle. Selbst wenn dieses nutzbar gemacht wird, fehlt ein nochmal so

großer Teil, der neben anderen regenerativen Energiemethoden zum Erreichen der Energieziele bis 2050 erschlossen werden muss, wenn gleichzeitig der Energiebedarf um die Hälfte gesenkt wird.

Dazu sollen vor allem bisher genutzte Biomassen effizienter und energiegewinnender verwendet werden. Dabei rückt die Dezentralisierung der Nutzung von Biomasse immer mehr in den Vordergrund, d.h. die Nutzbarmachung direkt am Entstehungsort bzw. am Verbraucherort ohne lange Transportwege. Beispielsweise werden Landwirte durch Biogaserzeugung mit Abfallstoffen zu Energieerzeugern, die dezentral erzeugt und genutzt werden kann. Die Effizienz ist am höchsten, wenn die energetische Nutzung nach der eigentlichen Nutzung einer Biomasse stattfindet (FNR, 2015).

Die Ressourcen sind vielfältig und damit auch die daraus gewonnenen Energieträger. Je nach Verfahren stehen Energien gespeichert und speicherbar in Biomassen in fester, flüssiger oder gasförmiger Form zur Verfügung, um je nach Bedarf Wärme, Strom oder Biokraftstoffe zu generieren. Neben der privaten Nutzung, wie Pellet-Heizungen, werden industriell Dampferzeuger, Biogasanlagen oder Holzheizkraftwerke betrieben. In Müllverbrennungsanlagen wird die Biomasse innerhalb des Abfalls mit verbrannt und teilweise zur Stromerzeugung der Anlage genutzt. Die erzeugten Bioalkohole, -öle und -kraftstoffe werden größtenteils in konventionelle Verfahren beigemischt.

In allen Verfahren besteht ein großes Potential der Optimierung. Da sich diese Arbeit mit der stofflichen und Strom-generierenden Nutzung einer cellulosehaltigen Abfall-Biomasse beschäftigt, wird im Folgenden hauptsächlich auf diese eingegangen.

Papier als Biomasse wird zur energetischen Nutzung bislang hauptsächlich Müllverbrennungsanlage beigemischt verbrannt. Der Brennwert von Papier liegt bei 15 MJ/kg, 4,2 kWh/kg (im Vergleich Holzpellets: 18 MJ/kg oder 4,9 kWh/kg) (Klinge, 1989; Gavrilesco, 2008). Die Wärmeenergie wird meist vor Ort genutzt, da alle nicht recyclingfähigen Papierarten, wie Hygienepapiere, keine andere Verwendung finden dürfen. Durch Verunreinigung oder Anreicherung toxischer Substanzen müssen diese dem Abfallkreislauf entnommen werden. Falls diese Fraktion als Bioabfall verrottet, bleibt die enthaltene chemische Energie jedoch ungenutzt (Boie, 1957).

BRUTTOSTROMPRODUKTION 2017

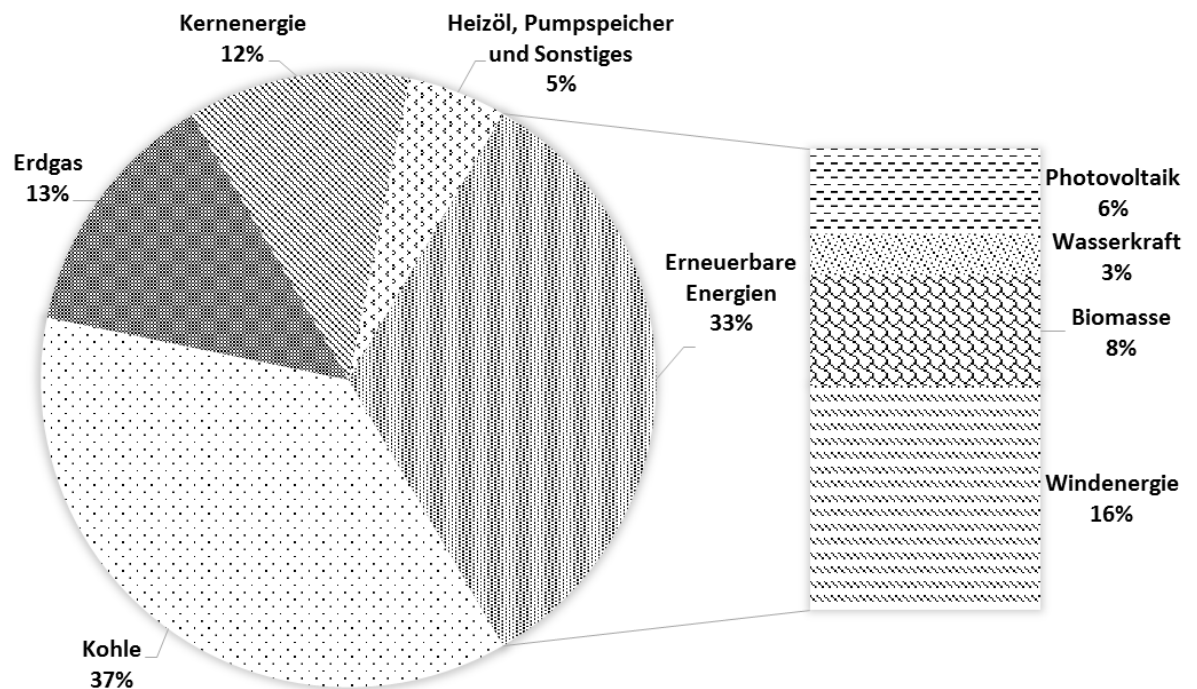


Abbildung 1: Bruttostromerzeugung in Deutschland 2017. Als Teil der erneuerbaren Energien, die gut ein Drittel der Produktion ausmachen, ist die Biomasse-Nutzung mit 7,8% ein Bereich, der vergrößert werden soll. Nach (Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR), Februar 2018)

Am 02.05.2018 war in Deutschland, am 01.08.2018 der weltweite, „*Earth Overshoot Day*“ – der "Erdüberlastungstag", an dem alle Ressourcen, die selbst produziert wurden, verbraucht waren. Das heißt, ab diesem Tag wurden alle in Deutschland produzierten Ressourcen aufgebraucht und der weitere Bedarf musste über Importe gedeckt werden, weltweit bedeutet es, dass mehr Ressourcen verbraucht wurden, als sich regenerieren können. Dadurch erscheint das Energieziel, das sich die Bundesregierung bis 2050 gesteckt hat zwar schwer erreichbar, aber nötig. Im Jahr 2017 betrug der Anteil der erneuerbaren Energien der Bundesrepublik Deutschland etwa 33% (Abb. 1), wobei ca. 7,8% aus Biomasse gewonnen wurden (Arbeitsgruppe Erneuerbare Energien-Statistik; Bundesministeriums für Wirtschaft und Energie).

1.2. Papier

Als kohlenstoffreiche Biomasse bietet sich nicht mehr recyclingfähiges Papier an. Dessen Struktur und bisherige Nutzung wird in den kommenden Kapiteln aufgezeigt.

1.2.1. Herstellung und Zusammensetzung

Im Februar 2017 veröffentlichte die Confederation of European Paper (CEPI) die vorläufigen Statistiken für 2016. In diesem Jahr war die Produktion von Papier und Karton bei ca. 410 Mio. Tonnen weltweit. Die Produktion in den europäischen Mitgliedsstaaten der CEPI lag bei etwa 91 Mio. Tonnen. Wobei die Recyclingrate mit 10,3% und einer Menge von etwa 43,3 Mio. Tonnen etwa 0,3% über der des Vorjahres lag. Trotzdem bleibt eine große Menge relativ reiner Cellulose ungenutzt. In den kommenden Kapiteln soll dargestellt werden, inwiefern sich diese als Biomasse in biotechnologischen Prozessen verwenden lässt und damit der ungenutzte Anteil verkleinert werden kann.

Die Herstellung von Papier und deren Weiterentwicklung in unterschiedliche Papierarten hat eine etwa 2000-jährige Geschichte, bei der aufgeschwemmte Pflanzenfasern während der Entwässerung auf einem Sieb zu Papier werden. Grob bestehen Papiere aus Holzstoff, Zellstoff und Additiven. Je nach Art und Anwendungsziel können laut dem Verband Deutscher Papierfabriken e.V. mehr oder weniger große Anteile aus recyceltem Altpapier zugemischt sein. Durch Aufarbeitung von Altpapier werden die beinhalteten Fasern jedoch durch die Aufarbeitung, Wasch-, Entfärbe- und Aufquellungs-schritte meist kürzer und daher das Einsatzfeld danach kleiner. Holzstoffe sind feinstoffreiche Fasern, die im Papier für eine geschlossene Oberfläche und damit Blickdichte sorgen. Diese werden durch mechanische teilweise heiße Zerfaserung von Holz gewonnen. Der Zellstoff besteht dagegen aus langen Fasern, die das Papier reißfest machen. Hierzu werden meist Holzhackschnitzel oder auch Stroh und Gräser chemisch aufgeschlossen, sodass Harze und Lignine abgeschieden werden. Je nach Verfahren werden Sulfit- oder Sulfat-Zellstoffe erhalten. Zusätzlich wird ein Bleichschritt mit Sauerstoff, Wasserstoffperoxid oder Chlorverbindungen, wenn nötig, durchgeführt. Papierhandtücher und Toilettenpapier gehören zu den Papiersorten, die im feuchten Zustand gekreppt werden, dabei werden die relativ kurzen Fasern gepresst, wodurch die Dehnbarkeit erhöht und das Papier mechanisch unempfindlicher wird (Verband Deutscher Papierfabriken e.V.).

Papiere sind zudem nach Blechschmidt (2013) bis zu 8% mineralische Verbindungen, sogenannte Füllstoffe und Pigmente, zugemischt. Diese dienen z.B. zur Partikelgrößenverteilung, zur Modellierung unterschiedlicher Oberflächen, dem Weißgrad, der Reaktivität oder der Dichte des Papiers. Häufigen Einsatz finden hier Calciumcarbonate,

auch Kaolin und Talkum, sowie seltene Spezialminerale (Silica, Gips, BaSO_4 , TiO_2). Die eingesetzten Füllstoffe und Pigmente haben dabei eine mittlere Partikelgröße von 0,5 – 3 μm . Etwa 3% der Masse können zudem chemische Additive ausmachen. Neben Stärke und Aluminiumverbindungen werden synthetische Additive eingesetzt, wobei die größte Gruppe Polymerbildner sind. Diese Additive dienen entweder der Charakterentwicklung des Papiers (Nassfestmittel, Komplexbildner, Farbstoffe u.a.) oder werden zur Prozessoptimierung (Entschäumer, Flockungsmittel u.a.) zugegeben. Diese Additive verbleiben teilweise im Papier (Blechsmidt, 2013).

1.2.2. Cellulose

Cellulose $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$ ist ein Polysaccharid, das aus 1,4- β -glukosidisch verknüpften D-Glucose-Einheiten besteht. Cellobiose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) stellt als Disaccharid einen Grundbaustein dar, welcher wasserlöslich ist. Durch Verlängerung der Cellobiosekette entsteht ein Cellulose-Makromolekül, welches wiederum Wasserstoff-Brücken ausbildet, sodass die einzelnen Polymere zu Fibrillen verbunden werden. Durch diesen Aufbau besteht Cellulose teilweise aus mikrokristallinen Bereichen, welche unlöslich in Wasser sind (Azizi Samir *et al.*, 2005; Moon *et al.*, 2011; Poletto *et al.*, 2013).

Cellulose ist eine der am häufigsten in der Natur vorkommenden Verbindungen, da es in pflanzlichen Zellen als Gerüstsubstanz dient. Mindestens 40% eines Baumes bestehen aus Cellulose. Fasern, wie Baumwolle, Hanf, Jute und Flachs, sind fast reine Cellulose und dienen in der Textil-, der Papier- und Bauindustrie als wertvoller regenerativer Grundstoff.

1.2.3. Mikrobielle Nutzung cellulosehaltiger Biomassen

Die Weiterverwendung und das Recycling von Biomassen, neben der Primärnutzung, hängen stark von der Art der Biomasse ab. In einigen Bereichen, wie in der Papierindustrie, werden bereits große Teile recycelt. Ein anderer Teil wird nur noch verbrannt und damit zur Energiegewinnung genutzt. Daneben gibt es einen stetig wachsenden Anteil an Biomasse, die auch in der Biotechnologie eingesetzt wird.

Eine Vielzahl an Veröffentlichungen und Übersichtsartikeln haben sich mit der gesteigerten Nutzbarkeit cellulosehaltiger Biomasse durch Vorbehandlungen beschäftigt. Grob können die Methoden dafür in vier unterschiedliche Kategorien eingeteilt werden: physikalische (z.B.

mechanisches Zerkleinern), chemische (wie alkalische, saure Hydrolyse, hydrothermale oder nasse Oxidation) oder biologische (enzymatische) Vorbehandlung (Lynd *et al.*, 2002; Taherzadeh and Karimi, 2008; Pu *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2015). Der Nachteil dieser Methoden ist der relativ hohe Bedarf an Energie und Chemikalien, die initial zur Nutzbarmachung aufgewendet werden müssen, im Gegensatz zu der Energie, die theoretisch in der chemischen Struktur der Cellulose steckt. Daneben können chemische Schlämme oder Abwässer entstehen, die erst aufwendig geklärt werden müssen. Zusätzlich zu chemischen Methoden führen hohe Temperaturen und Druck zur Depolymerisation, wodurch ein anschließender enzymatischer Schritt erleichtert wird (Holtzapfle *et al.*, 1992; Alizadeh *et al.*, 2005; Kumar and Wyman, 2009; Yang *et al.*, 2011). Der Einsatz von Mikroorganismen produzierten cellulolytischen und hemicellulolytischen Enzymen ist die gängigste Art, Bioethanol herzustellen (Shi *et al.*, 2011). Dafür werden hauptsächlich Enzyme thermophiler Bakterien und Pilze verwendet (Szczo drak *et al.*, 1982; Puls *et al.*, 1985; Méndez Arias *et al.*, 2016; Ellilä *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2017). Zum Beispiel ist hierfür die β -Glucosidase ein industriell bereits eingesetztes Enzym, das vor allem in Bakterien für die Aufspaltung von Cellobiose in Glucose verantwortlich ist (Brodeur-Campbell *et al.*, 2012).

Daneben werden auch thermophile Cellulasen von Stämmen, wie *Pseudomonas putida*, produziert (Tozakidis *et al.*, 2016). Die meisten Produktionsstämme, wie Algen, Bakterien oder Pilze, können effektiv nur kurze Zucker, wie Glucose, verwenden, die durch Vorbehandlungen der Biomassen entstehen (Yoza and Masutani, 2013; You *et al.*, 2017; Nisha *et al.*, 2017). So wird zunächst zur biologischen Nutzbarmachung ein chemischer oder physikalischer Schritt vorgeschaltet. Nur selten werden Mikroorganismen (MO) als Biokatalysatoren ohne oder mit wenigen Vorbehandlungen verwendet. *Clostridium thermocellum* kann bei einem optimalen pH-Wert von 7 und 60°C Cellulose, Zuckerrohr Stroh und Baumwolle als Substrat verwenden. Dafür setzt es Cellulasen und Xylasen frei (Leitão *et al.*, 2017).

In der Natur kommen Cellulose abbauende Mikroorganismen u.a. im Verdauungssystem von Insekten und Larven und Wiederkäuern vor. Dabei wurden hauptsächlich Vertreter der Gattung *Bacillus* sp. und Vertreter des Phylums der Firmicutes gefunden. Kaum detektiert waren Spezies, wie *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Cohnella* und *Staphylococcus*. Das Phylum der Actinobacteria (*Agromyces* spp. und *Microbacterium* spp.) und *Pseudomonas* spp., *Achromobacter* spp., *Enterobacter* spp. und Vertreter des Phylum Bacteroidetes zeigen ebenfalls MO eines Cellulose abbauenden Konsortiums (Manfredi *et al.*, 2015).

Um Biomassen biotechnologisch verwenden zu können, müssen diese effizient über Mikroorganismen abgebaut oder in wertvollere Chemikalien umgebaut werden. Zur Biogas- oder Bioethanol-Produktion werden bislang effizient Biomassen mit großem Zuckeranteil eingesetzt (Mielenz, 2001). Langkettige Kohlenstoffverbindungen werden, wie in Biogasanlagen, in mehrstufigen Prozessen abgebaut. Grundsätzlich sind dafür zunächst die Hydrolyse der Cellulosefasern über Cellobiose zu Einfachzuckern und die Fermentation oder Veratmung zu Alkoholen, Lösungsmitteln oder Biogas nötig. Anaerob kann bislang nur der cellulosehaltige Teil einer Lignocellulose verwendet werden (Abb. 2). Für jeden Schritt haben sich sowohl in der Natur als auch im Labor unterschiedliche MO als effektiv herausgestellt. Je nachdem, ob der Abbau und Umbau besondere Bedingungen (z.B. pH-Wert, Temperatur, Gasphase) benötigt, sind die Abbauschritte räumlich getrennt oder gemeinsam möglich.

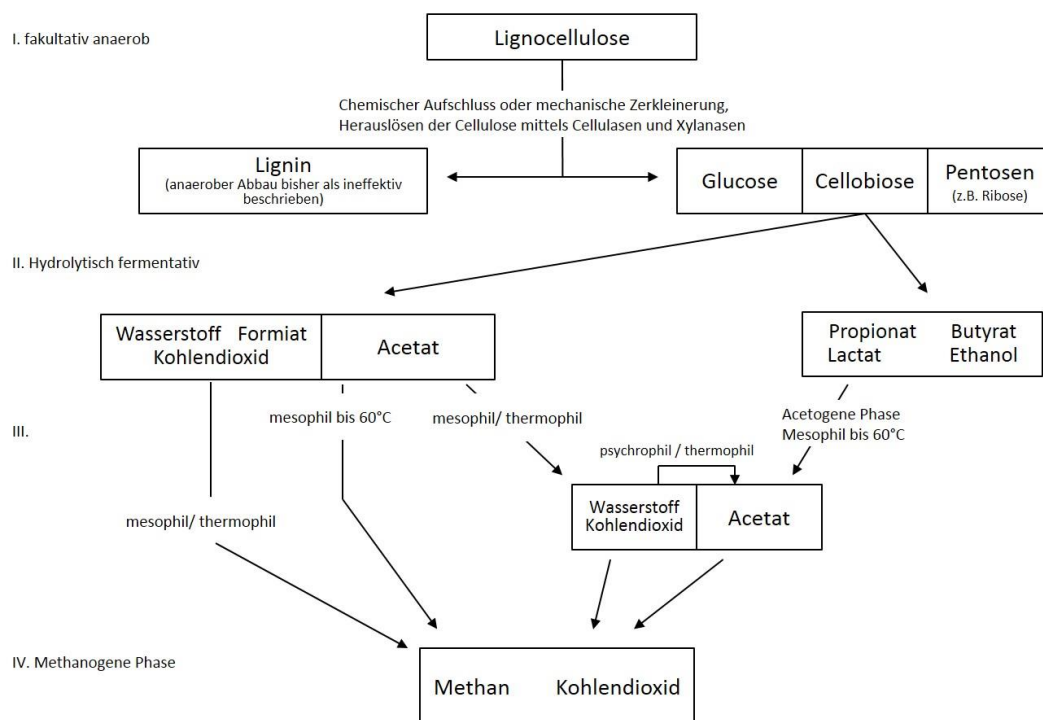


Abbildung 2: Anaerober Lignocelluloseabbau. Lignin ist bislang durch lange Fermentationsdauer (> 290 d, ca. 17% Abbau) biotechnologisch anaerob kaum verwendet worden (Benner *et al.*, 1984). Phase III und IV sind obligat anaerob, Phase I und II sind auch fakultativ anaerob möglich. Phase IV ist stör anfällig für Temperaturen bei 20-30°C, hohen Konzentrationen organischer Säuren und läuft überwiegend im neutralen pH-Wertbereich ab. Der thermophile Abbau läuft durch Methanogenese über die Acetatoxidation bevorzugt vor dem mesophilen ab. Ein hoher Wasserstoffpartialdruck kann zur Störung der acetogenen Phase (III) führen (Sawatdeenarunat *et al.*, 2015; Chandra *et al.*, 2015).

Die Effizienz eines Biomassenabbaus über einen mehrstufigen Prozesses wird als höher eingestuft als für einen Prozess, bei dem die Biomasse nur mit durch Vorbehandlungen

aufgeschlossen wurde. Die Ausbeute eines in anaerob und aerob unterteilten Systems wurde u.a von Shan *et al.* (2017) untersucht. Hier wurde der Abbau von Sulfat und chemischem Sauerstoffbedarf (CSB, engl. *chemical oxygen demand* - COD) kombiniert mit Methanproduktion beschrieben (Shan *et al.*, 2017). Durch eine lange Gärphase unter neutralem pH-Wert werden vor allem organische Säuren als Endprodukte kohlenhydrathaltiger Substrate produziert, wobei Acetat und Propionat den größten Anteil einnehmen. Bei $< \text{pH } 6$ unter CO_2 -Atmosphäre wird hingegen vermehrt Butyrat gebildet (Arslan *et al.*, 2016). Ahmadi *et al.* (2017) zeigt in seinem Übersichtartikel, dass die Ausbeute von Propionat am größten ist, wenn *Propionibacterium acidipropionici* in Reinkultur mit Glycerol als Substrat verwendet wird. Die Fermentation zu Propionat ist abhängig von der Prozessdurchführung, dem pH-Wert, der Temperatur, der Wahl des Substrats, der Verweilzeit, dem Inokulum und der Stickstoffquelle (Ahmadi *et al.*, 2017). Stöchiometrisch entsteht aus Glucose (als Monomer der Cellulose) bei Anwesenheit von Wasserstoff Propionat: $\text{Glucose} + 2 \text{H}_2 \rightarrow 2 \text{Propionat} + 2 \text{H}_2\text{O}$ ($-279.4 \text{ kJ pro mol Glucose}$).

Abhängig von der Zusammensetzung des Konsortiums können acetogene MO mit hydrogenotrophen Methanogenen um die Nutzung des Wasserstoffs konkurrieren. Acetogene Bakterien bilden entweder durch Reduktion von CO_2 mit H_2 Acetat oder bauen längere Fettsäuren oder Alkohole in Acetat und CO_2 und H_2 ab. Weitergehend kann Propionat zu Acetat abgebaut werden, das wiederum von acetoklastischen Methanogenen zur Methanproduktion genutzt werden kann: $\text{Acetat} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$ (-33 kJ).

1.3. Metabolismus organischer Säuren

1.3.1. Synthesewege für Propionat

Wie bereits beschrieben, werden bei Gärungsvorgängen organische Säuren, wie Propionat und Butyrat als End- oder Zwischenprodukte gebildet. Deren Aufbau kann über unterschiedliche Intermediate erfolgen (Abb. 3). Neben Kohlenhydratverbindungen, wie Zuckerarten, können Lactat, Succinat oder Aminosäuren als Substrat verwendet werden. Grob können diese in fermentative, biosynthetische und Aminosäure-Wege eingeteilt werden. In den Fermentationspfaden werden verschiedene Kohlenstoffquellen über den Acrylat-Weg, den 1,2-Propandiol-Weg oder den Wood-Werkmann-Zyklus zu Propionat umgesetzt. Katabol können Aminosäuren und anabol, also zum Zellwachstum, Pyruvat und CO_2 verwendet

werden. Hierbei ist die Redox-Bilanz limitierend, wobei reduziertere Substrate, wie Glycerin, eine bessere Bilanz liefern. Die Bilanz bei der Verwendung von Zuckern fällt am besten aus (Stowers *et al.*, 2014). Die Produktion über den Wood-Werkmann-Zyklus, der über Succinat mit dem Citratzyklus verbunden ist, ist der energetisch ertragreichste Weg. Diesen Weg nutzen hauptsächlich Propionibakterien (Tsurumi *et al.*, 2000; Navone *et al.*, 2018).

Natürlich wird Propionat jedoch nur mit einer geringen Ausbeute hergestellt, wobei die produzierenden MO meist eine geringe Wachstumsrate aufweisen. Die mikrobiellen Produzenten müssen zudem stresstolerant sein. Als ökonomisch sinnvoll wurde eine Ausbeute von 1,52 mol Propionat pro mol Glucose (1 g/L/h) gesetzt, die bis zum Jahr 2020 erreicht werden soll (Rodriguez *et al.*, 2014). Einige Publikationen und Übersichtsartikel haben sich bereits mit der Effizienzsteigerung der Propionatproduktion befasst, wobei Temperatur, pH-Wert, Substrat, Bakterienstamm(-zusammensetzung), Fermentationsmodus und Begasung unterschiedlich kombiniert untersucht wurden (Barbirato *et al.*, 1997; Coral *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015). Eine der größten Herausforderungen ist die Bildung von Nebenprodukten, wie Acetat, da nicht genug Energie oder Redox-Äquivalente aus den Propionatsynthesewegen entstehen können. So sind die biosynthetischen Wege über 3-Hydroxypropionat (3HP und 3HP/4HB; Abb. 3) industriell durch die Fixierung von CO₂ von Interesse. Da jedoch mindestens zwei ATP verbraucht werden ist dieser Weg für Organismen nicht energetisch von Vorteil (Berg *et al.*, 2007). Bisläng konnte der industrielle Einsatz nicht effektiv gezeigt werden. In Übersichtsartikeln, wie von Gonzalez-Garcia *et al.*, wurde jedoch der Fokus auf die alleinige Optimierung der Propionatproduktion ohne Nebenprodukte und vor allem mit Reinkulturen gelegt. Daher wird eine genetische Verbesserung eines natürlich schon gut produzierenden Stamms als am sinnvollsten erachtet (Gonzalez-Garcia *et al.*, 2017).

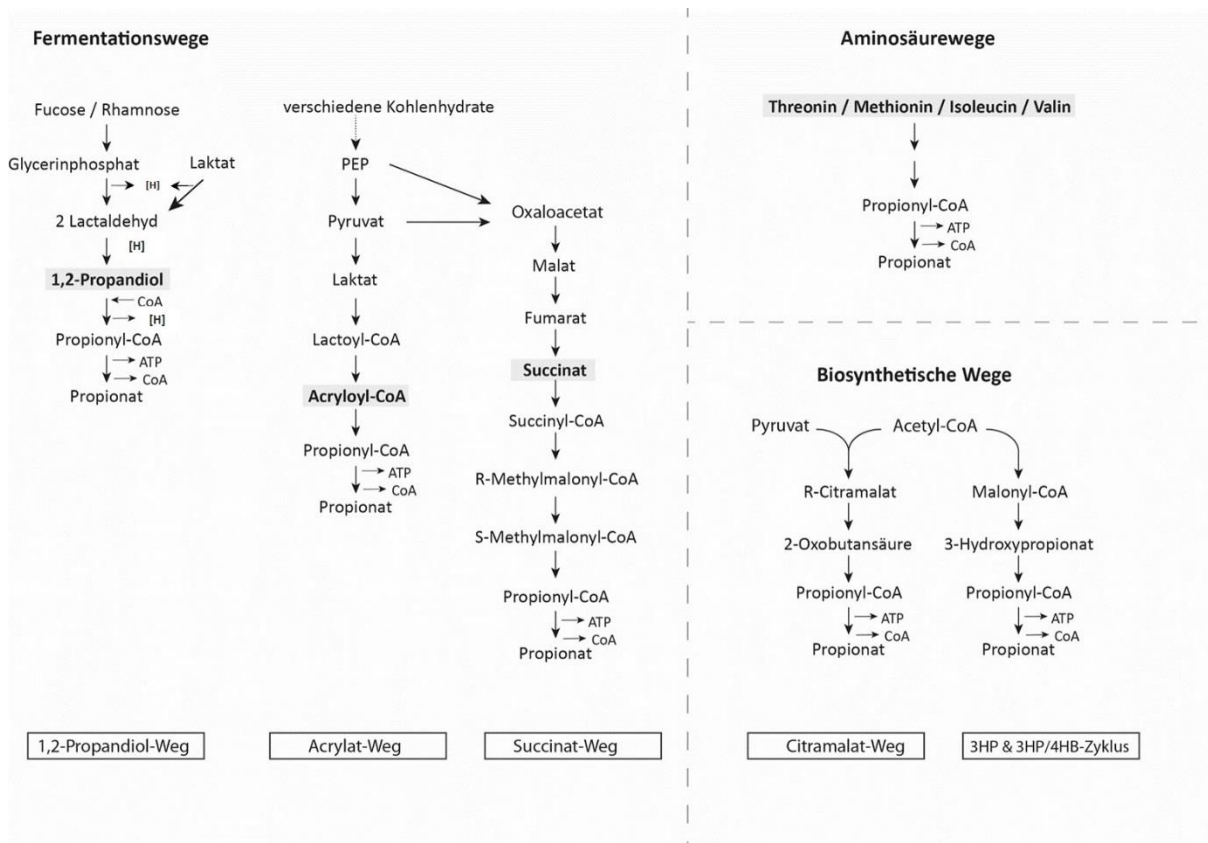


Abbildung 3: Produktionswege für Propionat. Für Propionat sind unterschiedliche Synthesewege bekannt, wobei sowohl Zucker, als auch Succinat, Laktat oder Aminosäuren als Substrate dienen können. Die Wege sind nach ihren prominentesten Zwischenprodukten benannt (nach Gonzalez-Garcia *et al.*, 2017).

1.3.2. Abbau organischer Fettsäuren

Über die Lipolyse werden Lipide hydrolytisch durch Lipasen gespalten. Dadurch entstehen sowohl in Eukaryoten als auch in Prokaryoten Fettsäuren und Glycerin, die über Oxidation weiter abgebaut werden (Ghosh *et al.*, 1996).

Der prominenteste Abbau-Weg organischer Fettsäuren erfolgt über die β -Oxidation von Acyl-CoA-Derivaten (Abb. 4), welche zuvor unter ATP-Verbrauch durch eine Acyl-CoA-Synthetase gebildet werden. Schrittweise werden in jedem Zyklus zwei Kohlenstoffeinheiten in Form von Acetyl-CoA abgespalten und je nach Länge (C_n) der Fettsäure durchläuft diese den Zyklus bis zum kompletten Abbau in Acetyl-CoA-Einheiten. Obwohl hier Fettsäuren unterschiedlicher Länge abgebaut werden, wird dieser Stoffwechselweg vor allem von Fettsäuren mit einer Länge ab 12 Kohlenstoffatomen induziert (Clark, 1981). Zunächst bildet sich durch die FAD-haltige Acyl-CoA-Dehydrogenase eine *trans*- α,β -Doppelbindung. Dafür wird ein Flavoprotein, welches reduziert wird, benötigt. Das entstandene *trans*-2-Enoyl-CoA wird unter Wasserverbrauch über eine Enyl-CoA-Hydratase zu 3-Hydroxyacyl-CoA. Dieses wird

wiederum unter NADH-Generierung katalysiert durch eine 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase zu β -Ketoacyl-CoA dehydriert. Im letzten Schritt erfolgt die thiolytische Spaltung der α -C β -Bindung durch die β -Ketoacyl-CoA-Thiolase, wobei Acetyl-CoA frei wird und ein um zwei C-Atome verkürztes neues Acyl-CoA-Intermediat gebildet wird, das erneut in den Zyklus eintreten kann. Die gebildeten Reduktionsäquivalente NADH + H⁺ fließen in die Atmungskette und dienen der ATP-Synthese. Acetyl-CoA wird über den Citratzyklus vollständig oxidiert. Fettsäuren mit ungerader Kohlenstoffanzahl werden, wie beschrieben, abgebaut bis nur noch drei Kohlenstoffatome übrig sind. Dadurch entsteht ein Propionyl-CoA. Dieses fließt über den Propionat-Abbauweg weiter in den Citratzyklus. Ungesättigte Fettsäuren werden über zusätzliche Schritte in den β -Oxidationsweg eingeschleust. Dafür werden vorhandene cis-Doppelbindungen oder D-Stereoisomere zunächst über Isomerasen oder Epimerasen in trans-Bindungen bzw. L-Stereoisomere umgewandelt.

Daneben wurde ebenfalls der anaerobe Fettsäurestoffwechsel charakterisiert, bei dem z.B. Fumarat als terminaler Elektronenakzeptor genutzt wird und zusätzliche Enzyme, zu den bereits unter aeroben Bedingungen aktiven, genutzt werden (Campbell *et al.*, 2003).

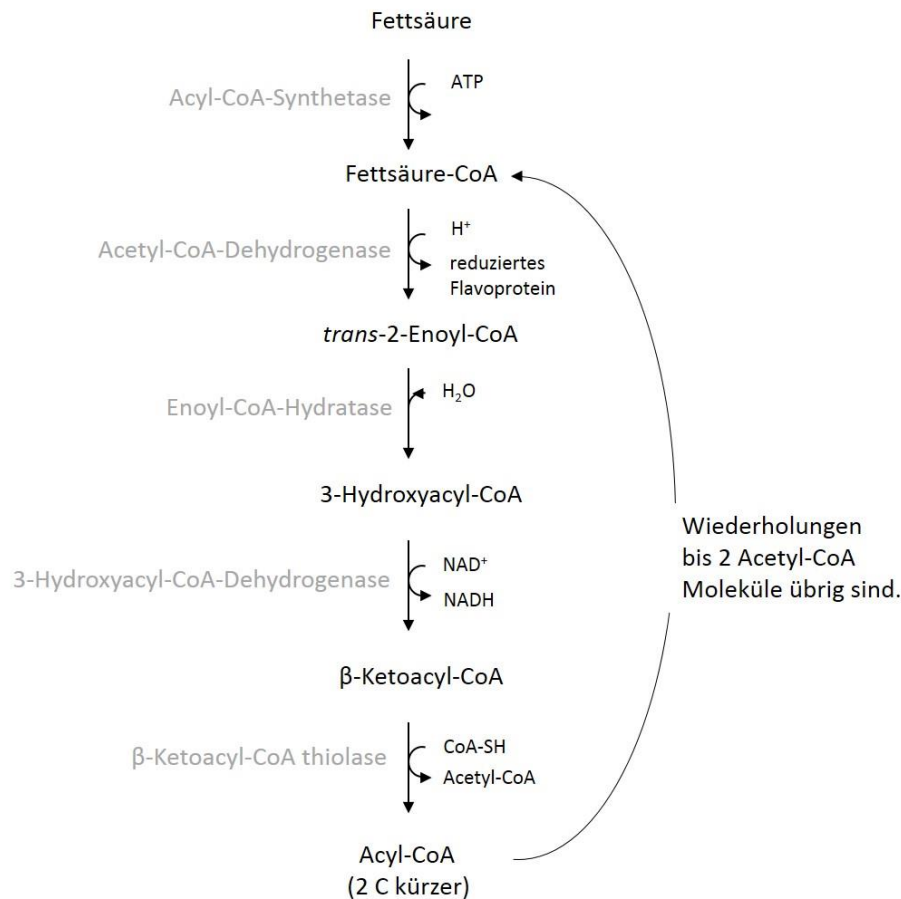


Abbildung 4: Schema der β -Oxidation zum Abbau von Fettsäuren. In jedem Zyklus werden zwei C-Verbindungen in Form von Acetyl-CoA abgetrennt und der Zyklus beginnt von vorn (nach Weiss, 1975).

Der anaerobe Abbau von Propionat ist thermodynamisch mit geringem Energiegewinn für die MO verbunden: $\text{Propionat} + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Acetat} + \text{CO}_2 + 3\text{H}_2$ (+76,0 kJ/mol) und kann in diesem Fall nur erfolgen, wenn die Produkte dieser Reaktion ständig entzogen werden (Thauer *et al.*, 1977).

1.3.3. Propionsäure als Substrat

Die Propionsäure ist eines der häufigsten Nebenprodukte von Biomassevergärungen und kann sowohl von Darmzellen als auch von Bakterien als Energiequelle aufgenommen und verwertet werden (Sakata *and* Yajima, 1984). Daneben findet es als antibiotischer Zusatzstoff in der Lebensmittelindustrie Verwendung. Gänzlich untersucht wurde dieser Effekt bislang noch nicht. Es wird davon ausgegangen, dass die Moleküle aufgenommen in der Zelle durch Akkumulation das Zellwachstum blockieren, dissoziieren und dadurch zu einem Stopp der protonenmotorischen Kraft führen. Dadurch wird die Zelle zu einer Ionenfalle. (Salmond *et al.*, 1984; Horswill *et al.*, 2001). Einige MO, wie *Salmonella*-Arten oder *E. coli*, können Propionat

ebenfalls als Substrat nutzen. Für den Abbauweg über u.a. 2-Methylcitrat werden die Enzyme des *prp*-Operons benötigt (Horswill *and* Escalante-Semerena, 1997). Das sogenannte Divergon, ein in zwei Transkriptionseinheiten geteiltes Operon, kodiert zum einen für einen Transkriptionsregulator (σ^{54} -Faktor), der das Gen-Cluster *prpBCDE* reguliert. Bei *E. coli* K12 befinden sich in diesem Operon zusätzlich zwei REP-Regionen (*repetitive extragenic palindromic sequences*), REP25 und REP26 (Blattner *et al.*, 1997a). Wie in Abb. 5 schematisch dargestellt, wird Propionat unter ATP-Verbrauch mittels der Propionyl-CoA-Synthetase (PrpE) zu Propionyl-CoA umgesetzt (Textor, Wendisch, De Graaf, *et al.*, 1997). Darauf folgt die Verknüpfung des Propionyl-CoA mit Oxalacetat aus dem Citratzyklus durch PrpC (2-Methylcitrat-Synthetase) zu 2-Methylcitrat. Dieses 2-Methylcitrat kann durch Hemmung der Fructose-1,6-Bisphosphatase (FBPase), einem Enzym der Gluconeogenese, toxisch durch Inhibierung des Zellwachstums wirken (Rocco *and* Escalante-Semerena, 2010). Im weiteren Schritt wird durch PrpD (2-Methylcitrat-Dehydratase) 2-Methylcitrat zu 2-Methylisocitrat isomerisiert und über PrpB (2-Methylisocitrat-Lyase) in Pyruvat und Succinat gespalten. Das entstandene Succinat und Pyruvat kann wiederum in den Citratzyklus eingeleitet und dort weiter umgesetzt werden (Abb. 5).

Die Regulation des *prp*-Operons ist durch das komplexe Zwischenspiel verschiedener Faktoren beeinflusst, jedoch noch nicht genau aufgeklärt. Grundsätzlich wird zur Transkription der Regulator PrpR benötigt, der dem Operon vorgeschaltet ist. Dieser wird zuvor durch 2-Methylcitrat, den σ^{54} -Faktor und dem *integration host factor* (IHF) aktiviert (Horswill *and* Escalante-Semerena, 1997; Tsang *et al.*, 1998; Palacios *and* Escalante-Semerena, 2000). Zudem wird vermutet, dass der CRP-Komplex beteiligt sein könnte (Lee *et al.*, 2005). Von Lee und Keasling wurde gezeigt, dass proportional zur Konzentration von Propionat der Promotor $P_{prpBCDE}$ induziert wird. Durch die Verwendung des Substrats als Induktor ist dies die kostengünstigere Methode, als z.B. eine zusätzlich eingebrachtes IPTG-induziertes Expressionskonstrukt zu verwenden (Lee *and* Keasling, 2005; Lee *and* Keasling, 2008).

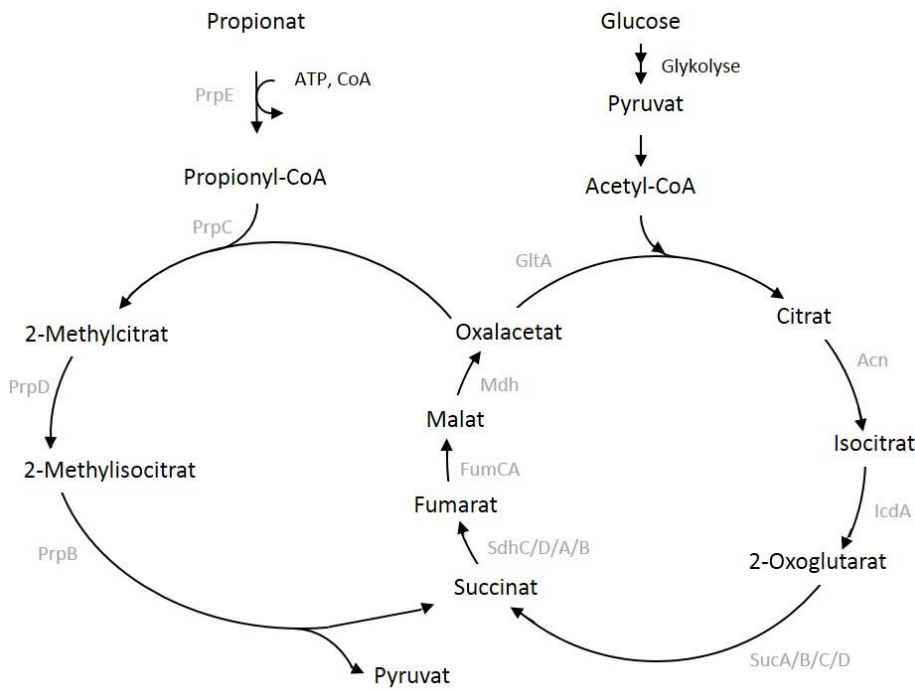


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Propionat-Abbauwegs in *E. coli* über den 2-Methylcitrat-Zyklus mit der Verbindung zum Citratzyklus. Nach (Textor, Wendisch, Graaf, *et al.*, 1997; Simonte *et al.*, 2017)

Von Simonte *et al.* wurde 2017 gezeigt, dass die Deletion von *rnr*, dem Gen, das für die RNase R codiert, zu einem erhöhten Wachstumsrate und Propionatverbrauch unter anaeroben und aeroben Bedingungen führt (Simonte *et al.*, 2017). Die RNase R ist eine magnesiumabhängige 3'-5'-Exoribonuklease, die ähnliche Funktionen zur RNase II übernimmt. Bei beiden Enzymen handelt es sich um unspezifisch wirkende Ribonukleasen, die lineare RNA abbauen und dadurch 5'-Nucleotidmonophosphate freisetzen (Cheng *and* Deutscher, 2002). RNase R hat zusätzlich eine Helikase-Aktivität, wodurch Sekundärstrukturen erkannt und aufgelöst werden können (Andrade *et al.*, 2009; Awano *et al.*, 2010). Die Sekundärstrukturen werden durch repetitive Sequenzen, REP-Sequenzen, gebildet. Diese gelten allgemein als stabilisierende Strukturen, da sie meist vor Abbau der Nucleotidsequenzen durch RNasen schützen. In *E. coli* werden jedoch hauptsächlich diese von der RNase R (*rnr*) abgebaut, wobei als Ansatzpunkt ebenfalls die zwei REP-Sequenzen im *prp*-Operon dienen könnten. Daher wird vermutet, dass RNase R regulatorische Funktionen im Propionatabbauweg übernimmt. Da PrpE (erstes Enzym des Propionat Abbauwegs) als letztes Element auf dem Operon abgelesen wird und die Endonuklease von diesem Ende zuerst die Sequenzen abbaut, könnte bereits hier der Abbauweg gestoppt werden (Simonte *et al.*, 2017). Die Expression von *rnr* wird unter Stressbedingungen hoch reguliert (Chen *and* Deutscher, 2005). Unter solchen Bedingungen werden vor allem Stoffwechselwege, die zunächst durch ATP-Verbrauch aktiviert werden

müssen, herunter reguliert. Daher wäre eine Inhibierung des ersten Schritts im Propionatabbauweg unter Limitierungen, wie anaerobe Umgebungen, logisch. Wenn PrpE nicht exprimiert wird, verbraucht die Zelle durch die Produktion von Propionyl-CoA kein ATP und das für sie giftige Intermediat wird nicht angereichert.

Solche Sekundärstrukturen können unter anderem durch *Rho*-unabhängige Terminatorsequenzen oder repetitive extragene Palindromsequenzen, sogenannte REP-Regionen, gebildet werden. Daraus resultierende Sekundärstrukturen werden allgemein als stabilisierend erachtet, da sie die mRNA vor dem hydrolytischen Abbau durch RNasen wie RNase II und PNPase schützen, während sie für die RNase R als Substrat dienen können. Die genomische Struktur des *prp*-Operons in *E. coli* K12 weist sogar zwei solcher REP-Regionen auf.

1.4. Elektrochemische Systeme

Als Erweiterung der natürlich vorkommenden Elektronenakzeptoren, die von Bakterien genutzt werden, können synthetische Akzeptoren verwendet werden. Dieser Eigenschaft bedienen sich bioelektrochemische Systeme, in denen notwendige Elektronenübertragungen nutzbar gemacht werden. Zugrunde liegt allen in der Biologie verwendeten elektrochemischen Systemen die Funktionsweise einer Brennstoffzelle, durch die chemische Energie in elektrische umgewandelt werden kann (Abb. 6). Grundsätzlich wird ein Brennstoff, wie Wasserstoff in einem Wasserstoff/Sauerstoff-Aufbau, genutzt. Meist findet ein System Einsatz, bei dem zwei Elektroden durch einen Elektrolyten oder eine Membran getrennt sind. Die durch Oxidation des Wasserstoffs frei werdenden Elektronen fließen über die Anode durch den Potentialunterschied Richtung Kathode, an der Sauerstoff zu Wasser reduziert wird. Die Membran oder der Elektrolyt ist durchlässig für Ionen und Gase. Dadurch können entstehende H⁺-Ionen auf die Kathodenseite diffundieren und dort mit dem Sauerstoff zu Wasser reduziert werden (Behling, 2012). Je nach Anwendung unterscheiden sich der Aufbau und die verwendeten Bedingungen und Materialien (de Bruijn, 2005).

Werden organische Brennstoffe in Kombination mit Mikroorganismen als Katalysatoren verwendet, werden diese mikrobielle bioelektrochemische Systeme genannt. Zusätzlich gibt es enzymatische Systeme, die statt ganzer Mikroorganismen nur Enzyme, Antikörper oder DNA gekoppelt an das Elektrodenmaterial als Katalysatoren verwenden (Schröder *et al.*, 2015). Hierbei ist jedoch die Laufdauer an die Stabilität der Enzyme gebunden, wodurch Bedingungen, wie pH-Wert und Temperatur strikter eingehalten werden müssen, als in Systemen, die mit regenerierenden und teilweise nachwachsenden MO betrieben werden.

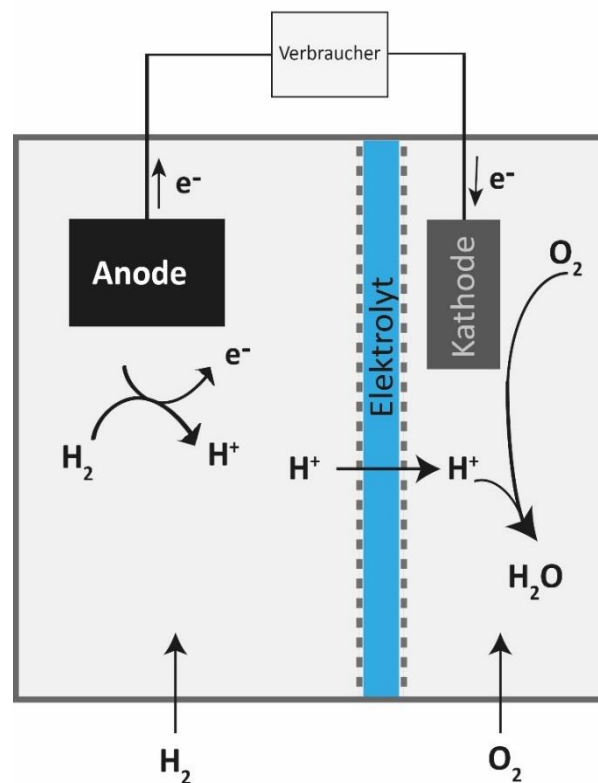


Abbildung 6: Allgemeiner Aufbau eines elektrochemischen Systems bzw. einer Brennstoffzelle.

1.4.1. Bioelektrochemische Systeme (BES)

Nach der Entdeckung einer Potentialerhöhung durch *E. coli* und *Saccharomyces cerevisiae* – Kulturen in einem bioelektrochemischen System im Jahr 1911 von M. C. Potter wurde dieses Forschungsfeld erst ab dem 21. Jahrhundert wieder aufgenommen (Potter, 1911). Einer der Hauptvorteile eines BES sind die milden Verfahrensbedingungen, die effizient bei RT oder auch neutralem pH-Wert gefahren werden können. Dies erleichtert den Aufbau und die Verwendung von Materialien und Medien, die ansonsten korrodieren können. Zudem wird

das größte Potential nicht in der Maximierung der Stromgewinnung gesehen, sondern in der kombinierten Stromgewinnung mit gleichzeitiger Abreinigung von Schadstoffen oder Abfallströmen. Mittlerweise können positive Nettoenergieerträge erreicht werden. Im Gegensatz zu konventionellen Brennstoffzellen können Substrate eingesetzt werden, indem die MO und der Aufbau entsprechend gewählt werden, die ansonsten nicht als Brennstoff verwendbar wären. Zahlreiche Forschungsgruppen befassen sich damit, dieser Methode als Erweiterung von Abwasserbehandlungen nutzbar zu machen (Pant *et al.*, 2010; Pandey *et al.*, 2016). Daneben gibt es kombinierte mikrobielle Brennstoffzellen, wie z.B. die Photosynthese gekoppelten (*photosynthetic (microalgae) microbial fuel cell* – PMFC) (Angioni *et al.*, 2018). Grundlage aller mikrobiellen elektrochemischen Technologien (MET) ist die Interaktion von Mikroorganismen mit einer Elektrode. Dabei unterscheiden sich kapazitive und faradaysche Elektronenübertragungswege. Die Kapazität der Elektrode wird im kapazitiven Weg durch die Anhaftung und das Ablösen der MO verändert, ähnlich einem Touchscreen, bei dem ebenfalls eine Weiterleitung durch leichte Berührung ohne Druck möglich ist. An der Elektrode wird ein ladungsausgleichender Strom aufgebaut, der zunächst unabhängig von den Stoffwechselfvorgängen in der Zelle ist. Der faradaysche Elektronenfluss dagegen ist an die Redox-Reaktion und an den extrazellulären Elektronentransport (EET) des MO gekoppelt (Schröder *et al.*, 2015). Einsatz findet diese mikrobiell katalysierte Technologie entweder durch die anaerobe Oxidation organischer Kohlenstoffverbindungen oder der Reduktion von beispielsweise CO₂ (Nevin *et al.*, 2010; Rosenbaum and Franks, 2014). Dadurch ergeben sich unterschiedliche Einsatzmöglichkeiten, wie die in den folgenden Kapiteln beschriebene mikrobielle Brennstoffzelle, die Elektrolysezelle oder die Elektrosynthesezelle.

Grundsätzlich wird in den meisten BES das Potential über einen Potentiostat kontrolliert und eingestellt. Dazu hat sich ein Aufbau mit drei Elektroden etabliert, der in der Literatur als M3C (*microbial 3-electrode cell*) beschrieben wird. Neben der Anode und der Kathode wird eine Referenzelektrode verwendet. Diese ist meist eine Ag/AgCl- oder eine Kalomel-Elektrode. Verbunden mit einem Potentiostat wird das Potential im Aufbau gemessen und gegebenenfalls eingestellt. Dazu misst der Potentiostat die Potentialdifferenz zwischen Anode und Kathode und stellt durch Polarisieren der Gegenelektrode (*counter electrode* – CE; in dieser Arbeit die Kathode) das angegebene Potential ein. Da das Arbeitspotential an der Anode vorliegen sollte, wird die Referenzelektrode so nah wie möglich an dieser installiert.

1.4.2. Mikrobielle Brennstoffzelle (MFC)

Die mikrobielle Brennstoffzelle (*microbial fuel cell*, MFC) ist dem Grundprinzip der klassischen Brennstoffzelle, dem galvanischen Element, am ähnlichsten und eine der ältesten bioelektrochemischen Systeme. Die MFC wird auch mit zwei räumlich getrennten Elektrodenkammern verwendet (Abb. 7). Im anoxischen Anoden-Kompartiment findet die Oxidation organischer Substanzen katalysiert durch MO statt. Hierbei werden u.a. Kohlenstoffdioxid, Ionen und Elektronen freigesetzt. Die Elektronen werden, wie in Kapitel 1.5 beschriebene Mechanismen auf die Anode übertragen und können von dort über einen Verbraucher oder einen Widerstand zur Kathode fließen. Freie Protonen diffundieren durch die separierende Membran ebenfalls ins Kathoden-Kompartiment und reagieren dort unter Sauerstoffreduktion und Elektronenaufnahme zu Wasser (Logan *and* Regan, 2006). Durch die Abgabe von Elektronen an die Anode und die Aufnahme durch Protonen an der Kathode, entsteht ein Stromfluss. Für die Reaktion muss zudem ein anoxisches Anoden-Kompartiment, um keinen anderen Elektronenakzeptor als die Anode zu bieten, und ein oxisches Kathoden-Kompartiment gegeben sein.

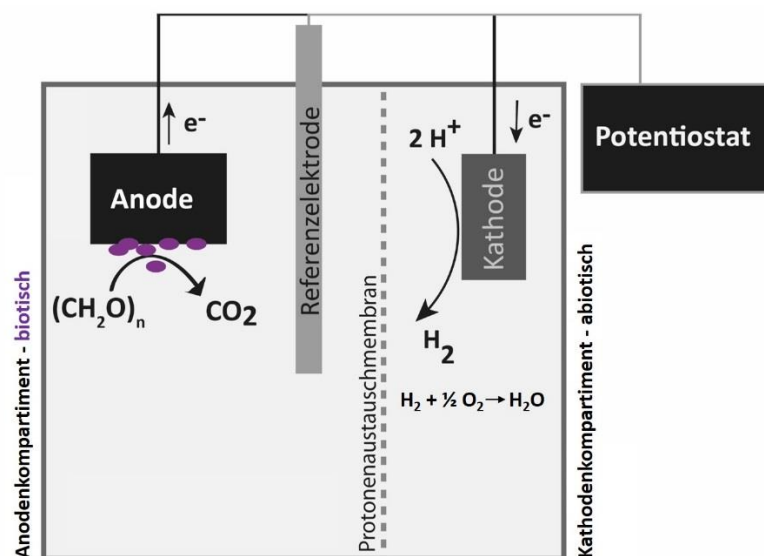


Abbildung 7: Aufbau einer mikrobiellen Brennstoffzelle (MFC). Dieses Schema zeigt exemplarisch die ablaufenden Redox-Reaktionen. Dabei übertragen MO Elektronen auf die Anode, die dann durch den Potentialunterschied zur Kathode fließen. Frei werdende Protonen diffundieren durch die Protonenaustauschmembran zur Kathode. Dort wird unter Elektronenaufnahme Sauerstoff mit den Protonen zu Wasser.

In einigen Fällen kann eine Elektronenübertagung nur bei einem bestimmten Potential ablaufen. Daher wird es durch einen Potentiostaten vorgegeben und mittels Referenzelektrode überprüft. Zahlreiche Veröffentlichungen befassen sich mit der

Optimierung von Aufbau, Potential, Material, der Verringerung von Widerständen und der Verbesserung der Leitfähigkeiten in BES (Du *et al.*, 2007; ElMekawy *et al.*, 2013; Logan *et al.*, 2018).

1.4.3. Weitere BES

Neben den mikrobiellen Brennstoffzellen gibt es abgewandelte BES, die ein weiteres Feld der Anwendungen abdecken. Zum einen das sogenannte mikrobielle Elektrosynthese-System (MES), in dem organische Verbindungen im Gegensatz zur MFC nicht abgebaut, sondern unter Elektronenaufnahme produziert werden. Hier werden die Elektroden durch eine Potentialvorgabe polarisiert, sodass an der Anode Wasser in Protonen und Elektronen gespalten wird. Wie in Abb. 8B gezeigt, migrieren diese in den Kathodenraum, wo die Elektronen von MO aufgenommen werden können (s. Kapitel 1.5). In der Bakterienzelle können die Elektronen auf terminale Elektronenakzeptoren, wie z.B. CO₂, übertragen werden und sind so nutzbar für Stoffwechselforgänge (Nevin *et al.*, 2010; Rabaey *and* Rozendal, 2010). Als Anwendung der MES bieten sich Stromüberproduktionen, wie bei Stromspitzen durch Solarzellen oder Windkraftanlagen an, um die Elektronen in chemischen Verbindungen unter CO₂-Fixierung zu speichern.

Ähnlicher zur MFC ist die Elektrolyse-Zelle (MEC, Abb. 8B), in der die Elektroden ebenfalls von der Anode zur Kathode fließen. Dieser Aufbau wurde erstmal 2005 von Liu *et al.* vorgestellt (Hong Liu *et al.*, 2005). Im Anodenkompartiment werden auch MO eingesetzt. Diese Technologie wird zur Produktion von Wasserstoff, Wasserstoffperoxid oder Methan genutzt (Call *and* Logan, 2008; Cheng *et al.*, 2009). Dafür wird eine externe Stromquelle benötigt und das Potential auf weniger als 0,2 V abgesenkt, bis die Reaktion ablaufen kann. Die Energie hierfür kann jedoch zum größten Teil aus der chemischen Energie der Anoden-Reaktion gezogen werden (Sleutels *et al.*, 2009). In der Kathoden-Kammer wird im Gegensatz zur MFC kein Sauerstoff verwendet, sodass hier Protonen zu Wasserstoff reduziert werden.

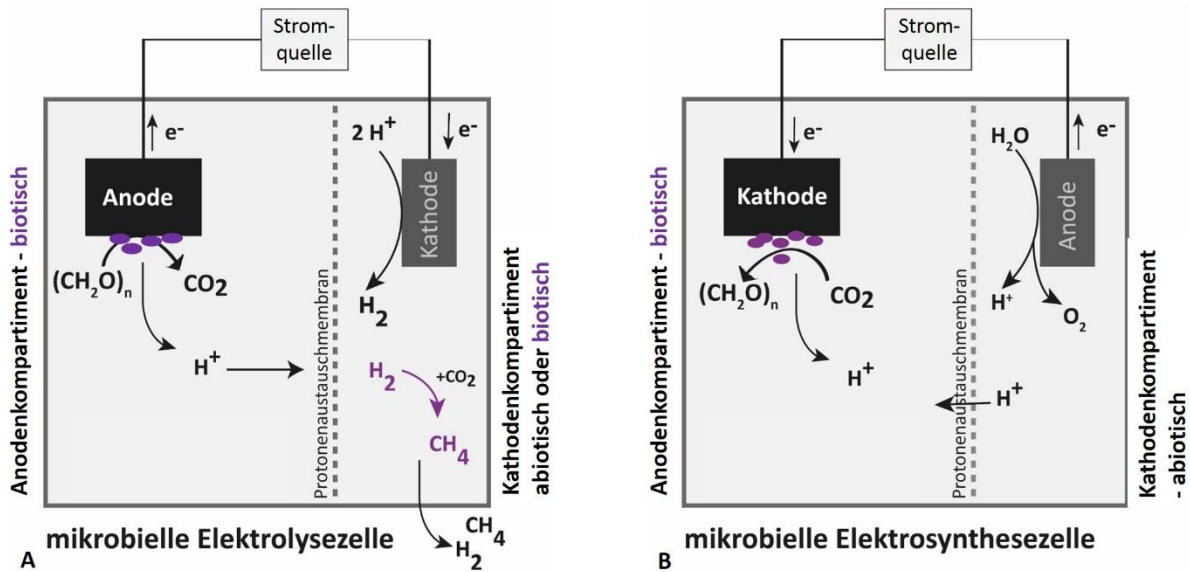


Abbildung 8: Schema der (A) mikrobiellen Elektrolysezelle (MEC) und der (B) mikrobiellen Elektrosynthesezelle (MES).

Daneben gibt es weitere Anwendungen, wie die mikrobielle Entsalzung. In diesem Aufbau wird eine dritte Kammer zwischen Anoden- und Kathodenkompartiment geschaltet. Membranen sorgen für eine selektive Abgrenzung, sodass die an der Anode entstandenen Protonen zur Kathode gelangen können, um dort wieder reduziert zu werden. Wird die zusätzliche Kammer mit dem zu entsalzenden Wasser gefüllt oder durchströmt, werden die enthaltenen Anionen zur Anode und die Kationen zur Kathode gezogen und so bis zu 90% der Salze entzogen (Cao *et al.*, 2009; Carmalin Sophia *et al.*, 2016). Diese Elektrodialyse kann daher zur Generierung von teilweise bis voll entsalztem Wasser, z.B. aus Brackwasser, genutzt werden (Campione *et al.*, 2018).

1.5. Extrazellulärer Elektronentransport (EE)

Um einen mikrobiellen Strom zu erzeugen, müssen von Mikroorganismen Elektronen freigesetzt werden und diese auf eine Anode übertragen werden. Generell geschieht dies am effektivsten, wenn keine anderen Elektronenakzeptoren als die Anode zur Verfügung stehen. Das Anodenmaterial und die Leitfähigkeit des Mediums, neben den äußeren Bedingungen, wie Temperatur, pH-Wert o.ä., spielen dabei ebenfalls eine große Rolle. Optimalerweise besitzt eine Anode eine gute Leitfähigkeit und einen geringen elektrischen Widerstand, ist biokompatibel, großflächig und chemisch und mechanisch stabil, ohne zu korrodieren (Zhou *et al.*, 2011). Anoden sollten eine gute bakterielle Bindung ermöglichen und dienen daneben

als Elektronensenke. Neben gut leitfähigen, aber meist teureren und glatten Anoden aus Platin, Edelstahl, Metalloxiden oder Titan werden vermehrt Graphit- oder Kohlenstoffstrukturen, leitfähige Polymere und Nanoröhren verwendet (Bruce Logan *et al.*, 2007; Kipf *et al.*, 2013; Hindatu *et al.*, 2017).

Für den Elektronentransport auf eine Elektrode müssen die eingesetzten MO in der Lage sein, Elektronen über ihre Membran zu transportieren und freizusetzen. Die durch Stoffwechselfvorgänge innerhalb der Zelle entstandenen Elektronen werden dafür über eine intrazelluläre Transportkette über die Zellmembran auf einen extrazellulären Elektronenakzeptor, wie eine Anode, übertragen. Die dazu befähigten MO werden exoelektrogene Mikroorganismen genannt. Sie können anaerob mit der Anode atmen. Die Zellen beziehen ihre Energie aus der Oxidation organischer Substrate. Je höher das Redoxpotential des Elektronenakzeptors im Gegensatz zum Donor ist, desto größer ist die Energieausbeute für den Organismus. Bei der aeroben Atmung dient Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor und bildet mit Wasserstoff das Redoxpaar mit der größten Energieausbeute ($E_0' = + 0,82\text{V}$; O_2 zu H_2). Über einen Protonengradienten kann die Zelle ATP generieren. Wird von der Zelle Glucose verwendet, können bis zu 32 ATP pro Glucose produziert werden. Für die anaerobe Atmung können weitere lösliche Elektronenakzeptoren, wie Nitrat, Nitrit oder Fumarat, oder unlösliche, wie Metallverbindungen (z.B. Fe^{3+} oder Mn^{4+}), neben einer Anode genutzt werden. Dabei kann durch Reduktion von Fe^{3+} die meiste Energie gewonnen werden, wobei generell der Energiegewinn der anaeroben Atmung geringer ausfällt als bei aerober Atmung (Thauer *et al.*, 1977). Einige MO sind in der Lage, Elektronen auf Elektronenakzeptoren außerhalb der Zelle zu übertragen (TerAvest *and* Ajo-Franklin, 2016).

Zur Übertragung der Elektronen von der Zelle auf einen externen Elektronenakzeptor sind unterschiedliche Mechanismen möglich. Je nach MO kann der Transfer entweder direkt oder indirekt über Elektronentransporter (engl. *shuttle*) oder leitfähige zelluläre Strukturen (*nanowires*) auf die Anode erfolgen. Für einen direkten Transfer müssen die Zellen zur Elektronenübertragung auf bzw. in der Elektrode sitzen (Abb. 9A). Über die an der Zelloberfläche verankerten Cytochrome fließen die Elektronen auf die Elektrode, wobei der Abstand der cytochromalen Häm-Gruppe zur Elektrode dafür höchstens 15 Å betragen darf (Sebastien Kerisit *et al.*, 2007). Cytochrome fungieren durch ihren Aufbau, mit Häm als

prothetische Gruppe, als Redoxvermittler zwischen Zelle und externem Elektronenakzeptoren.

Über leitfähige zelluläre Strukturen kann die Distanz zwischen Zelle und Anode vergrößert werden (Abb. 9B) (Creasey *et al.*, 2018). Hier haben sich unterschiedliche Mechanismen entwickelt. Ausstülpungen der äußeren Membran, die ebenfalls elektronenübertragende Cytochrome trägt, finden sich bei einigen MO, wie *Shewanella oneidensis* (Gorby *et al.*, 2006). Daneben gibt es Pili, welche ähnliche Elektronenleitfähigkeiten wie Metalle aufweisen. Diese Pili sind noch kontrovers diskutiert, grundsätzlich wirken sie jedoch wie Stromkabel, die Elektronen leiten können. Die Leitfähigkeit entsteht durch überlappende π - π Orbitale aromatischer Aminosäuren. *Geobacter sulfurreducens* ist dafür ein gut untersuchter Organismus (Reguera *et al.*, 2005).

Der Vorteil einer indirekten Übertragung ist die größere Distanz der MO zu Anode, so können ebenfalls planktonische Zellen Elektronen auf die Anode abgeben. Hierzu können auch Redox-Moleküle eingesetzt werden, sogenannte Shuttle oder Mediatoren (Abb. 9C) (Hernandez *and* Newman, 2001). Dadurch können einige Organismen, wie *Shewanella oneidensis*, welche z.B. Riboflavine als Elektronen-Shuttle sekretieren, die Effizienz der Elektronenübertragung erhöhen. Durch diese werden auch Zellen zur Elektronenübertragung befähigt, die weiter von der Anode entfernt sind (Marsili *et al.*, 2008).

Wiederum müssen synthetische Mediatoren dafür einige Parameter erfüllen, um in diesem System Elektronen transportieren zu können. Die eingesetzten Shuttles sollten reversibel an einer Zelloberfläche reduziert und an der Anode wieder oxidiert werden. Dafür dürfen u.a. keine toxischen Moleküle eingesetzt werden und sie müssen diffundieren und sollten nicht absinken.

Als Erweiterung der direkten Übertragung kann der direkte Interspezies-Elektronentransfer (DIET) gesehen werden (Dubé *and* Guiot, 2015). Dabei werden die frei werdenden Elektronen von einem MO zu einem anderen übertragen und gelangen erst im Anschluss auf die Anode. Bei diesem, in der Natur häufig in anaeroben Schlämmen und Biofilmen ablaufenden Elektronentransfer, übertragen z.B. exoelektrogene MO überschüssige Elektronen auf Methanogene zur Methanproduktion. Durch Transkriptom-, Radiotracer- und genetische Analysen konnten Rotaru *et al.* zeigen, dass *Methanosarcina harundinacea* Elektronen via DIET von *Geobacter metallireducens* zur Reduktion von Kohlendioxid zu Methan aufnehmen. Die Entdeckung, dass Methanosaeta-Arten, die in einer Vielzahl von methanogenen

Umgebungen vorhanden sind, zu DIET befähigt sind, ist auch hinsichtlich des Stoffaustauschs innerhalb von anaeroben Fermentern interessant (Rotaru *et al.*, 2014).

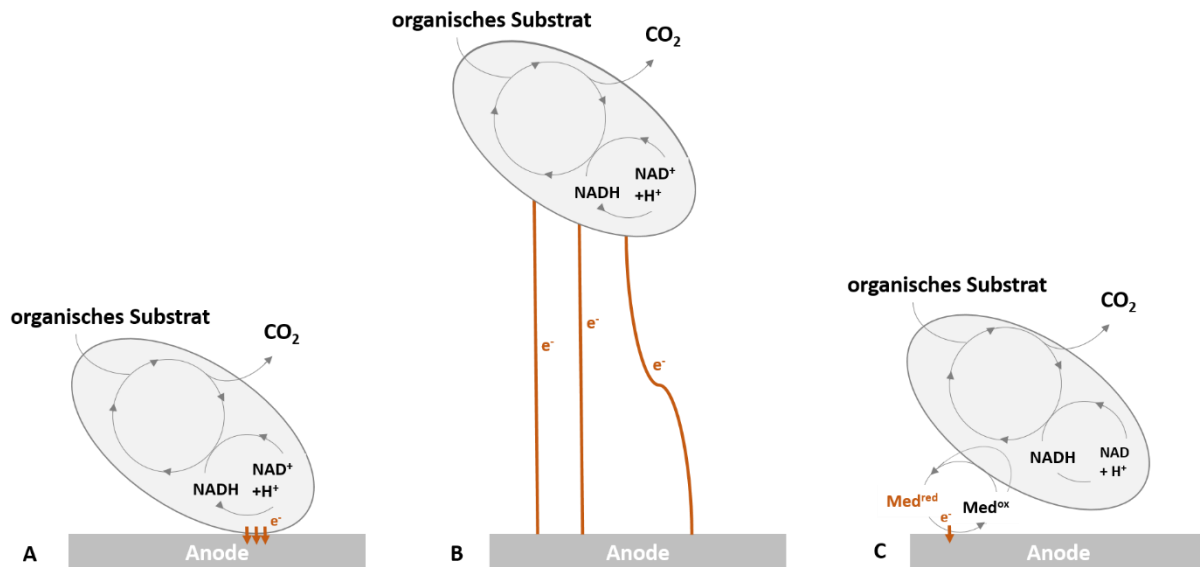


Abbildung 9: Schema der extrazellulären Elektronentransfer-Mechanismen. In orange sind die Elektronen dargestellt. (A) Die direkte Elektronenübertragung über membranständige Cytochrome unmittelbar auf die Anode. (B) Über leitfähige Pili oder Membranausstülpungen können größere Distanzen, auch in Biofilmen zwischen Zelle und Anode, überbrückt werden. (C) Damit auch planktonische Zellen Elektronen abgeben können, werden Redox-Shuttle verwendet. Dazu wird das Shuttle an oder in der Zelle reduziert und an der Anode wieder oxidiert.

1.5.1. Direkter Elektronentransfer

Als Voraussetzung der extrazellulären Elektronenübertragung müssen Elektronen vom Inneren der Zelle über das Cytoplasma auf die Zelloberfläche übertragen werden. Sind keine zusätzlichen Redox-Mediatoren beteiligt, handelt es sich um einen direkten Elektronentransfer. Als Bestandteil der Elektronentransportkette sind dafür *c*-Typ-Cytochrome essentiell (Schröder, 2007). *c*-Typ Cytochrome sind ubiquitär vorkommende Vermittler von Elektronentransferreaktionen der Atmung. Obwohl die Aminosäure-Sequenz unterschiedlich sein kann, besitzen alle mindestens eine Häm-Gruppe. Die Häm-Gruppe übernimmt als katalytisches Motiv u.a. die Bindung von Sauerstoff, die Elektronenübertragung oder -akkumulation (Julie M. Stevens *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2006). Umfassende Untersuchungen zur Struktur und Funktion wurden in einigen Übersichtsartikeln zusammengefasst (Julie M. Stevens *et al.*, 2004; Mowat and Chapman, 2005).

Bereits gut untersuchte Modellorganismen der direkten Elektronenübertragung sind u.a. *Shewanella oneidensis* und *Geobacter sulfurreducens* (Shi *et al.*, 2007). *S. oneidensis* MR-1

besitzt 42, *G. sulfurreducens* 111 *c*-Typ-Cytochrome, wohingegen z.B. *E. coli* nur 7 aufweist (Heidelberg *et al.*, 2002; Methe *et al.*, 2003).

S. oneidensis MR-1 besitzt cytoplasmamembranständige Oxidoreduktasen (NADH:Quinon Oxidoreduktase), die Elektronen auf den Menaquinonpool übertragen. Von dort werden sie von CymA (engl. **cytoplasmic membrane protein A**) auf *c*-Typ Cytochrome übertragen (Fu *et al.*, 2014, Myers & Myers, 1997). CymA ist ein tetra-Häm *c*-Typ Cytochrom, dessen Häm-Gruppe ins Cytoplasma zeigt (Schwalb *et al.*, 2003). Es ist ein essentieller Teil der anaeroben Atmungskette (Myers *and* Myers, 1997). Über periplasmatische Proteine, wie FccA oder STC, werden die Elektronen weiter zur äußeren Membran übertragen (Leys *et al.*, 1999; Meyer *et al.*, 2004; Sturm *et al.*, 2015). Nach Schütz *et al.* können die *c* - Typ Cytochrome Elektronen über das Periplasma weiter auf einen in der äußeren Membran verankerten Proteinkomplex (MtrA/B/C) übertragen werden (Schuetz *et al.*, 2009). MtrA und MtrC (**metal reducing protein A; C**) sind Dekahämproteine, MtrB (**metal reducing protein B**) ist ein β - Faßprotein, welches die Membran durchspannt. Durch die Einbettung von MtrA und C in die MtrB-Porin-Hülle könnte ein Elektronenaustausch möglich sein (Hartshorne *et al.*, 2009).

1.5.2. Elektronentransport und Stoffwechselfvorgänge in *G. sulfurreducens*

G. sulfurreducens PCA zeigt einen ähnlichen Mechanismus der Elektronenübertragung auf einen externen Elektronenakzeptor. Über die Oxidoreduktase werden die Elektronen auf einen Menaquinol – Pool und weiter auf MacA (engl. *membrane-associated cytochrome*) abgegeben (Methe *et al.*, 2003; Butler *et al.*, 2010). Die dekahäm-*c*-Typ Cytochrome OmcA und MtrC (beide terminale Reduktasen) werden über das Typ II Sekretionssystem an die Membran gebracht (Shi *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2012). Wie *S. oneidensis* bildet *G. sulfurreducens* leitfähige Fortsätze für einen Elektronentransport über längere Distanzen aus. Bei *G. sulfurreducens* bestehen diese jedoch nicht aus Proteinen, sondern sind Ausstülpungen der äußeren Membran und des Periplasmas. Besonders an der Elektronenübertragung von *Geobacter*-Biofilmen ist, dass diese auch ohne lebende Zellen, leitfähig sind. Bisher herrschen hier zwei Hypothesen. Bei der ersten, dem sogenannten *multistep electron hopping*, wird davon ausgegangen, dass die Elektronen zwischen den Cytochromen weitergeleitet werden (Snider *et al.*, 2012). Daneben könnten Elektronen auch durch PilA, einem Piliprotein, transportiert werden (Boesen *and* Nielsen, 2013). Überlappende π - π -Orbitale der in PilA

vorhandenen aromatischen Aminosäuren sollen dafür sorgen, dass diese *nanowire* dadurch metallähnliche Eigenschaften besitzen (Malvankar *et al.*, 2012; Vargas *et al.*, 2013). Für *Geobacter sp.* wurde zudem gezeigt, dass der Elektronentransport auch über Mediatoren, wie z.B. Huminstoffe in Sedimenten, ablaufen kann (Lovley *et al.*, 1996).

Geobacter sulfurreducens ist ein Vertreter der Familie Geobacteriaceae, der δ -Proteobacterien. Es konnte in unterschiedlichen Oberflächensedimenten, Abwasser- oder Schlamm-Proben nachgewiesen werden. Es ist ein obligat anaerobes, nichtfermentatives, unbewegliches gram-negatives Stäbchen. Acetat, Formiat und Lactat (wenig) können als Elektronendonoren verwendet werden. Die Verwendung von Pyruvat (in Gegenwart von Wasserstoff) als Kohlenstoffquelle und Elektronendonator ist bislang nicht eindeutig geklärt (Segura *et al.*, 2008). Als Elektronenakzeptor kann es neben Eisenverbindungen, Schwefel, Co(III) - EDTA, Fumarat oder Malat nutzen (Aklujkar *et al.*, 2009). Organische Verbindungen werden bis zu CO₂ oxidiert. Sein Temperaturoptimum hat es bei 30-35°C (Caccavo *et al.*, 1994; Ding *et al.*, 2008). Neben der Verwendung zur Bioremediation durch die Eigenschaft lösliche Metallverbindungen, wie Uran (Anderson *et al.*, 2003), zu unlöslichen zu reduzieren, wird es verwendet, um Abwasserströme unter Stromproduktion zu klären. Die Metallpräzipitation wurde vor allem in Grundwasser mit Acetat untersucht (Holmes *et al.*, 2002; Bond *et al.*, 2002). Ist Acetat in der Umgebung vorhanden, setzt sich *Geobacter* in bioelektrochemischen Systemen als dominante Art durch (Anderson *et al.*, 2003; Holmes *et al.*, 2007). Dabei fungiert Acetat als Aktivator durch den Umbau in Acetyl-CoA, welches in den Citrat-Zyklus eingeht. Acetat wird über die Acetat-Kinase (Ack) unter ATP-Verbrauch zu Acetyl-Phosphat und von der Phosphatransacetylase (Pta) zu Acetyl-CoA umgesetzt. Wie in Abb. 10 gezeigt, wird das dafür benötigte CoA von Succinyl-CoA abgespaltet und von der Acetyl-CoA Synthetase auf Acetyl-CoA übertragen (Segura *et al.*, 2008). Von Aklujkar *et al.* (2009) wird daher vermutet, dass geringe Mengen Acetat nicht effizient umgesetzt werden können (Aklujkar *et al.*, 2009). Neben anaeroben Elektronenakzeptoren kann *G. sulfurreducens* laut Lin *et al.* (2004) die Anwesenheit von bis zu 10% Sauerstoff tolerieren und diesen auch als Elektronenakzeptor verwenden (Lin *et al.*, 2004).

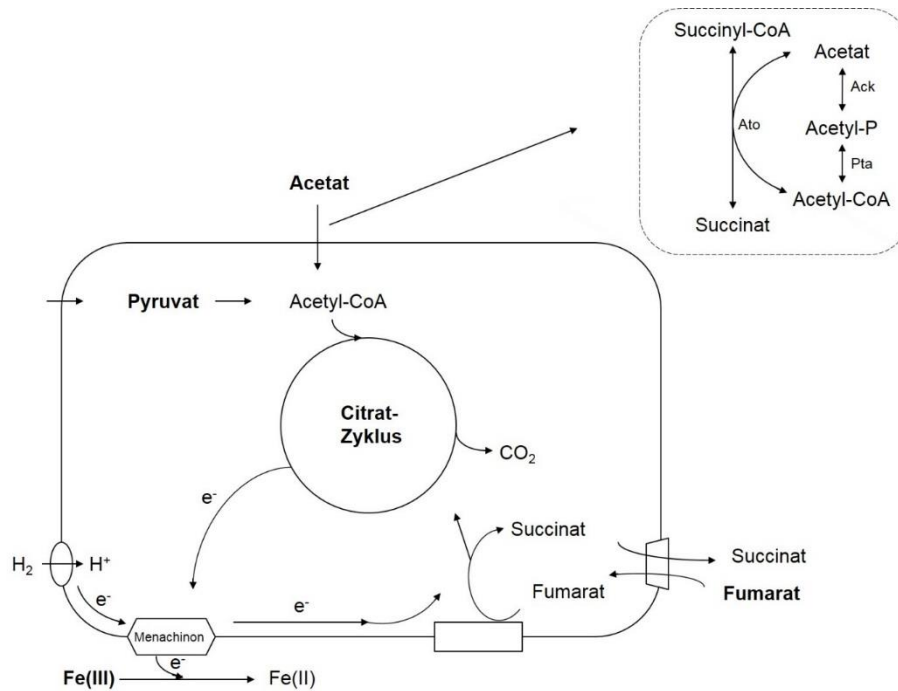


Abbildung 10: Schema der Atmung in *G. sulfurreducens*. Entweder Acetat oder Wasserstoff können als Elektronendonoren genutzt werden. Fumarat oder Fe(III) dienen hier als Elektronenakzeptor, wobei die Fumaratatmung Succinat innerhalb der Zelle produziert, das in den Citrat-Zyklus eingehen kann. Fett dargestellt sind alle extern der Zelle zugeführten Substrate. Um Acetat nutzbar zu machen, wird CoA von der Acetyl-CoA transferase (Ato) von Succinyl-CoA auf Acetat übertragen, wobei parallel Acetyl-P aus Acetat unter ATP-Verbrauch über eine Acetat-Kinase (Ack) generiert wird. Das CoA wird von einer Phosphotransacetylase (Pta) unter Phosphatabspaltung auf Acetyl übertragen, sodass Acetyl-CoA entsteht. (Nach Segura *et al.*, 2008)

1.5.3. Bakterien in BES

Geobacter sulfurreducens als Modellorganismus für Bioelektrochemische Systeme ist von zahlreichen Forschungsgruppen u.a. auch zur Abwasserreinigung in BES beschrieben. 2013 wurde von Jiang *et al.* nachgewiesen, dass eine Zelle 90 fA Strom an einer Elektrode produzieren kann (Jiang *et al.*, 2013). In Reinkultur wurden bis zu 4,56 A/m² Anodenfläche erreicht (Nevin *et al.*, 2008). *Shewanella oneidensis* wird ebenfalls als Modellorganismus, teilweise auch mit *G. sulfurreducens* zusammen, genutzt. Daneben sind primäre oder sekundäre Gärer oder nicht Eisen-atmende Bakterien in der Lage, Elektronen auf eine Anode zu übertragen. So wurde in BES für ein *Clostridium*, *Aeromonas*, *Rhodoferrax* und *Desulfobulbus* gezeigt, dass diese Elektronen auf eine Elektrode oder extrazelluläre Akzeptoren transferieren können (Park *et al.*, 2001; Pham *et al.*, 2003; Chaudhuri and Lovley, 2003; Holmes *et al.*, 2004). Die Mechanismen sind noch nicht vollständig bekannt, daher wird davon ausgegangen, dass die Akzeptoren hier als Elektronensenken fungieren und dies energetisch vorteilhafter ist, als zu fermentieren. Für andere Organismen, wie *E. coli*, konnte gezeigt werden, dass diese

Redox-Mediatoren selbst synthetisiert und dadurch Elektronen extrazellulär übertragen können (Zhang *et al.*, 2008). Ebenfalls möglich ist die Nutzung synthetischer Shuttle, wie Methylenblau oder Neutralrot, wodurch Roller *et al.* (2008) zeigen konnten, dass auch *Pseudomonas*- oder *Bacillus*-Arten Elektronen übertragen können (Roller *et al.*, 2008).

1.5.4. Abwasser als Substrat in BES

Neben der Charakterisierung der Elektronenübertragung von MO in Rein- oder Mischkulturen aus definierten Substraten ist die Energienutzung unter Abreinigung von Abfallströmen in den Fokus der Forschung gerückt. Parallel dazu wird auch die Rückgewinnung einiger Ressourcen, wie Stickstoff und Phosphat, die z.B. in der Landwirtschaft genutzt werden, untersucht (Batstone *et al.*, 2015). Die nutzbare Energie in Abwasserströmen in Form von Kohlenstoffverbindungen wurde u.a. von Heidrich *et al.* (2011) untersucht, welche den Energiegehalt eines gefriergetrockneten kommunalen Abwassers von 7,6 kJ/l und eines ebenfalls gefriergetrockneten Mischabwassers aus Industrie und Kommunen von 16,8 kJ/l ermittelten (Heidrich *et al.*, 2011). Da die Zusammensetzung eines Abwassers je nach Produzent schwankt, kann der Energiegehalt nicht pauschal angegeben werden, sondern hängt von der Zusammensetzung ab, die zu einem bestimmten Zeitpunkt vorhanden ist. Dieser ist bei industriellen Abwasserströmen, durch eine durchgängige Produktion, jedoch konstanter und meist höher. Vor allem Abwasser der Lebensmittelindustrie oder Industriezweige mit hohen Konzentrationen organischer Verbindungen als Abfallprodukte eignen sich als Substrat für MO zur Stromproduktion (Agler-Rosenbaum *et al.*, 2013; Pandey *et al.*, 2016; Gude, 2016). Generell wird im Abwasserbereich der nutzbare Anteil meist als chemischer Sauerstoffbedarf (CSB, engl. COD) oder in Laboranlagen als gesamter organischer Kohlenstoff (engl. *total organic carbon*, TOC) angegeben. So konnte von Mansoorian *et al.* (2013) gezeigt werden, dass mit Abwasser der Protein-Industrie 527 mA/m² (230 mW/m²) produziert werden können. Dabei wurde ein Abbau von 86% des COD (1,9 g/l auf 0,364 g/l) erreicht. Dafür wurde als Inokulum Belebtschlamm mit Bromo-Ethan-Sulfonat (BrES) versetzt verwendet (Mansoorian *et al.*, 2013). BrES wird zur Hemmung von methanogenen MO eingesetzt, da es als Struktur analog die reduktive Demethylierung von CH₃-S-CoM (2-Mercaptoethansulfonat) ab einer Konzentration von 10 µM stört (Gunsalus *et al.*, 1978; Balch *and* Wolfe, 1979). Die höchste publizierte Stromdichte mit industriellem Abwasser, die im Rahmen der Nachforschungen für diese Dissertation gefunden wurde, ist von Sakdaronnarong

et al. (2013) beschrieben. Hier wurde der im Ethanol-Destillationsvorgang anfallende Flüssigmüll verwendet (engl. *stillage*). Dieser Flüssigabfall der Ethanol-Destillation besteht aus Zuckern, wie Glucose und Fructose, und organischen Säuren (Choonut *et al.*, 2015). Die enthaltene COD-Menge wurde unter einer Leistungsdichte von 93 W/m² zu 81,5% abgebaut (Sakdaronnarong *et al.*, 2013). Dazu wurde ein System mit Lignin als Mediator verwendet, das ebenfalls als Inhibitor der Methanogenese wirkt und dadurch die Stromdichte und die Wasserstoffausbeute erhöhte (Yin *et al.*, 2000). Jedoch wurde in beiden Veröffentlichungen kein Coulomb-Wirkungsgrad angegeben. Dieser gibt das Verhältnis der übertragenen Elektronen, gemessen als Stromstärke, in Relation zur Elektronenmenge an, die durch Substratabbau frei wird (s. Kapitel 2.2.4.1 Berechnung der Coulomb-Effizienz).

1.6. Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Nutzbarmachung einer cellulosehaltigen Biomasse. Dazu sollte der Abfallstoff schrittweise unter Stromgenerierung und Produktion der Plattformchemikalie Acetoin abgebaut werden.

Im ersten Schritt sollten dazu zwei unterschiedliche Biomassen, Papierhandtücher und Holzpellets, unter verschiedenen Bedingungen als Substrat untersucht werden. Dazu sollte das Produktspektrum eines Abwassermixes unter fermentativer Umgebung genutzt werden. Es sollte der Einfluss des pH-Werts (pH 5, 6, 7) und der Gasphase getestet werden. Daneben wurde das System schrittweise in größeren Volumina getestet. Mit einem Gasphasenvolumen 4:1 im Vergleich zum Volumen der Flüssigphase, sollte der Einfluss der Gasphasen Wasserstoff/Kohlendioxid und Stickstoff auf die Produkte und die mikrobielle Zusammensetzung untersucht werden. Von Interesse war besonders unter welchen Bedingungen der Kohlenstoffgehalt in der löslichen Fraktion der organischen Säuren am höchsten ist. Für diese Fermentationsversuche sollte die Zusammensetzung des Konsortiums über die Zeit untersucht werden. Dazu sollte zu Beginn der Versuche und nach drei Jahren eine Amplikonsequenzierung mittels Illumina-Seq[®] angefertigt werden.

Das so entstandene Fermentat sollte im Anschluss als Substrat in einem M3C mit einem Biogaskonsortium (Perkolat) und *G. sulfurreducens* zur Stromproduktion verwendet werden. Dazu sollte untersucht werden wie effizient eine oder mehrere organische Säuren abgebaut werden können. Danach sollte das Fermentat wiederum als Substrat für einen Produktionsstamm zur Acetoinproduktion aus Propionat dienen. Dafür sollte zunächst durch

Wachstumsversuche aerob mit *E. coli* K12 und *S. oneidensis* und anaerob mit *G. sulfurreducens* gezeigt werden, dass das produzierte Fermentat als Kultivierungsmedium dienen kann. Weiterführend sollte ein *E. coli* K12 Stamm sowohl genetisch modifiziert, als auch an Propionat als Kohlenstoffquelle adaptiert werden. In einen *E. coli* K12 Δrnr sollten die zur Propionatproduktion befähigenden Gene *alsS* und *alsD* über ein Plasmid transformiert werden. In einer vorangegangenen Arbeit wurde der Einfluss der RNase R auf den Propionatmetabolismus gezeigt und sollte hier aerob weiter untersucht werden.

Zusätzlich sollte getestet werden, inwieweit das Fermentat über eine Nanofiltrationstechnik ankonzentriert werden kann. Dadurch sollte die Möglichkeit, eine konzentrierte Lösung organischer Säuren für die Produktion von Plattformchemikalien zu verwenden, untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Abwasser und Biomasse

Als Inokulum für die Fermentationsansätze wurde ein Mix verschiedener Abwasserquellen verwendet. Neben Abwasser der Emscher-Genossenschaft (Essen) und der Vorrechen-Stufe in Neureut (Karlsruhe) wurde ein Teil aus einem laufenden Denitrifizierungsversuch entnommen. Letzteres wurde verwendet, da hier zuvor keine methanogenen Mikroorganismen gefunden wurden.

Als Biomasse wurden handelsübliche Papierhandtücher verwendet, um einen definierten Abfallstoff einzusetzen. Zudem kann dieses, meist ohne Fremdverschmutzung, jederzeit als Trockensubstrat dem Müllzyklus entzogen und verwendet werden. Ansonsten wird diese Biomasse als Restmüll bzw. Hygienepapier in Müllverbrennungsanlagen verbrannt.

2.1.2. Bakterienstämme

Neben dem Abwassermix, der als Inokulum für die Fermentation verwendet und erst im Laufe der Arbeit charakterisiert wurde, wurden die verwendeten Laborstämme in der folgenden Tabelle (Tab. 2.1) zusammengefasst. Als Produktionsstamm wurde ein *Escherichia coli* K-12 verwendet und weiter genetisch adaptiert. *Shewanella oneidensis* wurde zur Untersuchung des Fermentats als Substrat für MO verwendet. Neben dem angegebenen *Geobacter sulfurreducens* Stamm wurde in dem verwendeten biochemischen System (Kapitel 2.1.7) ebenfalls ein Konsortium zur Abreinigung von organischen Säuren unter Stromgewinnung verwendet. Dieses Konsortium, im weiteren Verlauf als Perkolat bezeichnet, wurde in einer anderen Arbeit (Schmidt *et al.*, 2018a) charakterisiert und stammt aus einer Biogasanlage der Universität Hohenheim.

Tabelle 2.1: Alle in dieser Arbeit isoliert verwendeten Bakterienstämme und Plasmide.

Stamm/Plasmid	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i> K12 (JG109) <ul style="list-style-type: none"> • K12 Δrrn (JG943) • K12 Δrrn_pMAL_alsSD • K12 adaptiert_pMAL_alsSD 	Wildtyp Stamm <ul style="list-style-type: none"> • Δrrn, ΔkanR • JG943 pMAL_alsSD, • JG109 pMAL_alsSD, 	(Blattner <i>et al.</i> , 1997b) (Baba <i>et al.</i> , 2006; Simonte <i>et al.</i> , 2017) Diese Arbeit; (Förster <i>et al.</i> , 2017) Diese Arbeit
<i>Geobacter sulfurreducens</i> subsp. <i>sulfurreducens</i> PCA (JG 543)	synthetic sequence; 453226::kan Barcode	(Dolch <i>et al.</i> , 2015)
<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 (JG7) <ul style="list-style-type: none"> • JG1039 	Wildtyp Stamm JG 7 Δ SO_2939-SO_3013, Δ ackA Δ pta mit pBAD-alsSD	(Venkateswaran <i>et al.</i> , 1999) (Bursac <i>et al.</i> , 2017)
pBAD-alsSD	Km ^R , P _{para} _alsSD	(Bursac <i>et al.</i> , 2017)

2.1.3 Software, Datenbanken

Die zur Erstellung dieser Arbeit benötigte Software und Datenbanken, neben üblichen Büroprogrammen, sind in Tabelle 2.2 zusammengefasst.

Tabelle 2.2: Die in dieser Arbeit verwendeten Datenbanken und fachspezifische Software.

Software/Datenbank	Hersteller
BLAST (Basic local alignment search tool) (nucleotide blast, megablast)	NCBI (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)
CLC Genomics Workbench Software (Version: 10.1.1) → Microbial Genomics Modul	Quiagen; Venlo, Niederlande
ImageJ	http://rsb.info.nih.gov/ij/
LASAFApplication - Mikroskopsoftware	Leica
MultiWin® 4.09.01	Analytik Jena

NOVA - Reaktorstrom-Software	Metrohm
Silva – high quality ribosomal RNA Database	Gewartet von der Ribocon GmbH in Bremen in Kooperation mit der Arbeitsgruppe für Mikrobielle Genomik und Bioinformatik am Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie in Bremen und der Jacobs University (Pruesse <i>et al.</i> , 2007; Quast <i>et al.</i> , 2013)

2.1.3. Chemikalien, Enzyme, Reagenzien und Kits

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders gekennzeichnet, über die Firmen AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Life Technologies (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Steinheim) und VWR (Darmstadt) bezogen.

Die verwendeten Enzyme, Reagenzien und Kits sind in Tabelle 2.3 aufgelistet. Alle mehrfach konzentrierten Lösungen wurden einfach konzentriert eingesetzt, wie im Kapitel 2.2 Methoden für die jeweilige Anwendung beschrieben.

Tabelle 2.3: Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Kits

Produkt	Hersteller
1 kb DNA Ladder	New England BioLabs (Frankfurt am Main)
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	AppliChem (Darmstadt)
6x DNA Loading Dye Solution	Fermentas (St. Leon-Rot)
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)
MangoMix	Bioline (Luckwalde)
MidoriGreen	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Wizard® SV Gel and PCR Clean up System	Promega (Mannheim)

2.1.4. Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer, deren Sequenzen und Zielsequenzen sind in Tabelle 2.4 dargestellt.

Tabelle 2.4: Zusammenfassung der für PCR-Überprüfungen verwendeten Primer

Primerpaar	Sequenz 5' → 3'	Zielsequenz und Referenz
27F Universal 1492R	AGAGTTTGATCCTGGCTCA GGTTACCTTGTTACGACTT	Bacteria 16S rRNA (Lane, 1991; Rainey <i>et al.</i> , 1992)
27F (degeneriert) 1525R (degeneriert)	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG AGAAAGGAGGTGWTCCARCC	Bacteria 16S rRNA (Lee <i>et al.</i> , 2010)
Arch20F A519F	TTCCGGTTGATCCYGCCRG CAGCMGCCGCGGTAA	Archaea 16S rRNA (Massana <i>et al.</i> , 1997)
ITS1 ITS4	TCCGTAGGTGAACCTGCGG TCCTCCGCTTATTGATATGC	Pilz 5,8S rDNA (White <i>et al.</i> , 1990)
pMAL_for: pMAL_rev:	CCAGTCCGTTTAGGTGTTTTTC ACGTTGTAAAACGACGGCCAGT	pMal-Plasmid

2.1.5. Sonden

Die für die Fluoreszenz - *in situ* - Hybridisierung (FISH) in Kapitel 2.2.7.1 beschriebenen Sonden wurden in Tabelle 2.5 zusammengefasst. Hier wurden Fluoreszenz - markierte Sonden, die an spezifische DNA - Sequenzen binden, verwendet. Alle aufgelisteten Sonden wurden bei Eurofins (Hamburg) erworben. Die Formamid-Konzentration (FA) und der Fluoreszenzfarbstoff am 5' - Ende sind angegeben.

Tabelle 2.5 Für Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung verwendete DNA-Sonden.

Sonde	Ziel	DNA-Sequenz 5' → 3'	Referenz	Farbstoff	FA [%]
ARCH915	16S rRNA Archaea	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	(Raskin <i>et al.</i> , 1994)	FITC (Fluoreszein Isothiocyanat)	20
EUB399-I	16S rRNA Eubacteria	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	(Amann <i>et al.</i> , 1990)	Cy3 (Cyanin 3)	0 – 50

2.1.6. M3C-Bioelektrochemisches System (3-Elektroden-Messprinzip)

Als zweiten Schritt zur Abreinigung und Generierung von Strom aus einer cellulosehaltigen Biomasse wurde das System der bioelektrochemischen Zelle genutzt. Im Rahmen dieser Arbeit

wurde ein drei-Elektroden-System verwendet. Dieses beruht auf dem Aufbau mit Anode, Kathode und Referenzelektrode. *Geobacter sulfurreducens* oder das Konsortium (Perkolat) aus einer Biogasanlage der Universität Hohenheim diente als Biokatalysator. Das Arbeitsvolumen des Anodenkompartiments waren 270 ml, wie in Abb. 11 dargestellt (entworfen von Frederik Golitsch (Golitsch, 2016 unpublished)). Dieser Zwei-Kammern-Aufbau wird mit einem Drei-Elektroden-System verwendet. Räumlich durch eine Membran sind die Kompartimente von Anode und Kathode geteilt. Als Arbeitselektrode fungiert die Anode, während die Kathode die Gegenelektrode darstellt.

Die Anode ist ein Graphitvlies mit den Maßen 60 mm x 35 mm x 6 mm (BxLxH) und einer aktiven Oberfläche von 36 cm² (SIGRACELL® Carbon, GFD 2,5 EA, SGL Group; Wiesbaden). Da die Graphitfasern hydrophob sind, wurden die Vliesstücke in Isopropanol eingelegt und im Anschluss mehrfach langsam in H₂O_{dd} gewaschen, um den Alkohol mit Wasser auszutauschen, wodurch das Vlies, wenn es nass gehalten wurde, hydrophil blieb. Als Stromabnehmer wurden Kanülen (0,80 x 120 mm; B. Braun, Melsungen) verwendet. Die Kanüle wurde durch die Breite der Anodenfläche geführt und über den Arbeitselektrodenhalter mit einem Silikonseptum abgedichtet aus dem Deckel herausgeführt. Dort wurde die Elektrode mittels Bananenstecker mit einem Potentiostat verbunden.

Die Kathode bestand aus einem Platinnetz mit den Abmessungen 5 mm x 10 mm (1024 Maschen pro cm²; Durchmesser von 0,06 mm; Chempur, Karlsruhe). Hier wurde das Netz zunächst mit einem Platindraht verbunden und dieser wiederum mit einer Edelstahlschraube, die aus dem Deckel des Aufbaus herausragt. Die Verbindung wurde über eine Krokodilklammer und einen Bananenstecker mit dem Potentiostat verbunden. Das Kathodenkompartiment hatte ein Volumen von 10 ml, das mit Kathodenmedium gefüllt wurde (Tabelle 2.15 und 2.16). Zwischen Anode und Kathode wurde eine Protonen-Austausch-Membran (fumapem F-950, 50 µm Dicke, Durchmesser 1,9 cm, Fumatech; Bietigheim-Bissingen) eingeschraubt. Vor dem Autoklavieren wurde der Gegenelektrodenhalter mit doppelt destilliertem Wasser gefüllt und mit einer Ausgleichskanüle versehen.

Die verwendeten Referenzelektroden waren Silber-Silber-Chlorid (Ag/AgCl) Elektroden (Sensortechnik Meinsberg GmbH; Ziegra-Knobelsdorf), die mit gesättigter KOH gefüllt waren. Diese wurden wiederum mit dem Potentiostat verbunden.

Alle drei Elektroden (Anode, Kathode und Referenzelektrode) wurden vor Versuchsstart hinsichtlich ihrer Leitfähigkeit mittels Multimeter getestet. Gegebenenfalls wurde der

Stromsammler oder die Verbindungen überprüft bzw. die Referenzelektrode luftfrei neu befüllt. Im Anschluss wurden die Elektrodenhalter mit Dichtungsringen bzw. Silikonunterlegscheiben abgedichtet und in den Deckel eingeschraubt (Abb. 11). Daneben wurden zusätzlich drei Beprobungsports eingebaut und ebenfalls abgedichtet. Einer dieser fungierte im Versuch als Begasungsport mittels Kanüle. Der Aufbau wurde mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ aufgefüllt, ein Magnetrührstab (Roth) hinzugegeben und der Deckel mittels Gewindestäben verschlossen. Zwischen Deckel und Glasgefäß (DURAN; Mainz) wurde ein Silikonring zur Abdichtung gelegt. Alle Öffnungen wurden mit Alufolie verschlossen. Durch den Abdichtungsgummi des Kathodenhalters wurde eine kurze Kanüle mit LuerLock-Verbinder und Schlauchstück als Überdruckablass gesteckt, damit während des Autoklaviervorgangs die Membran nicht reißen konnte.

Nach dem Autoklavieren wurde das Kathodenkompartiment steril mit Kathodenmedium über die installierte Schlauchverbindung gefüllt. Die Referenzelektrode wurde etwa 30 min mit UV-Licht (365 nm, Benchtop UV Transilluminator, UVP; Cambridge, UK) sterilisiert, im Anschluss bei Bedarf mit KOH-Lösung aufgefüllt und in den Referenzelektrodenhalter mit Gummiabdichtung steril eingebaut.

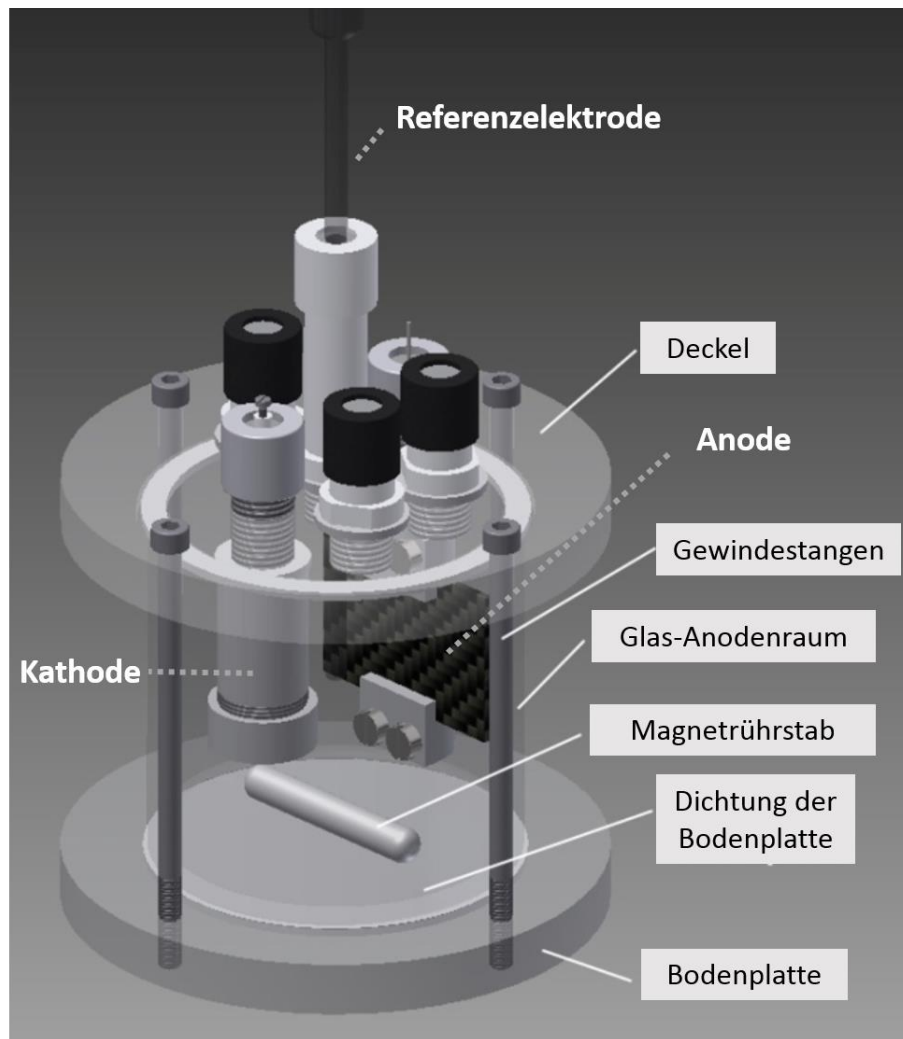


Abbildung 11: Aufbau der bioelektrochemische Zelle nach Golitsch (unveröffentlicht). In hellgrau hinterlegt sind alle baulichen Elemente. Die Elektroden wurden mit gepunkteten Strichen markiert. Der Anodenraum fasste 270 ml, der Kathodenraum 10 ml.

2.2. Methoden

In dieser Arbeit soll die Machbarkeit des Abbaus von Papierhandtüchern als Biomasse unter Produktion elektrischer Energie und Plattformchemikalien gezeigt werden. Dazu wurde ein dreistufiger Prozess getestet. Zunächst wurde ein Fermentationsprozess unter unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt, das entstandene Fermentat, das hauptsächlich die organischen Säuren Acetat, Propionat und Butyrat enthielt, sollte danach in einem bioelektrochemischen System unter Stromproduktion abgereinigt werden. Das Fermentat sollte zudem gegebenenfalls aufgereinigt und aufkonzentriert als Substrat zur Produktion von Plattformchemikalien genutzt werden.

2.2.1. Kulturmedien

Alle Medien wurden mit vollentsalztem Reinstwasser (H_2O_{dd}) hergestellt. Kulturmedien und deren Stocklösungen wurden autoklaviert und bei 4°C gelagert. Hitzelabile Lösungen oder Komponenten wurden mittels Sterilfiltern (Porendicke 0,2 μm ; "Filtropur S" von Sarstedt) steril hergestellt. Alle anaeroben Medien und Lösungen wurden in Schottflaschen mit Gummistopfen und einem Deckel mit zwei Löchern (mit jeweils einer Kanüle) unter Rühren aufgekocht, dadurch wurde Sauerstoff aus der Flüssigphase ausgetrieben. Durch volumenangepasste Begasungszeiten wurde nach Abkühlen des Mediums mit 80 % N_2 / 20% CO_2 für carbonatgepufferte Medien und N_2 für phosphatgepufferte Medien der restliche Sauerstoff ausgetrieben und ein Druckausgleich hergestellt. Nach dem Autoklavieren wurde gegebenenfalls mit hitzeempfindlichen Bestandteilen komplementiert. Der pH - Wert wurde durch Entnahme einer Probe mittels Spritze gemessen und anschließend mit steriler, anaerober HCl oder NaOH eingestellt.

Wurden Agarplatten für die Stammerhaltung verwendet, wurde das entsprechende Medium für aerobe Kulturen mit 20 g/l Agar-Agar versetzt und danach autoklaviert. Im Anschluss konnte es durch Aufkochen wieder verflüssigt werden, bevor hitzelabile Komponenten, wie Antibiotika, zugesetzt wurden. Für anaerobe Platten, wie für *G. sulfurreducens*, wurde das anaerobe Grundmedium ebenfalls mit Agar-Agar versetzt und im Anschluss anaerobisiert. Das autoklavierte Medium wurde flüssig dem Autoklav entnommen, bei ca. 60°C komplementiert und in einer Anaerobkammer in Petrischalen gegossen. Je nach Medienart wurden die Medien unter definierter Gasatmosphäre aushärten gelassen. Carbonatgepufferte Medien wurden

dazu mit Kohlenstoffdioxid begast. Die Kultivierung erfolgte in Anaerobtöpfen, die luftdicht verschlossen bei der gewünschten Temperatur und Gasphase inkubiert werden konnten.

2.2.1.1. Aerobe Medien zur Anzucht von *Escherichia coli* und *Shewanella oneidensis*

LB - Medium (engl. *Lysogeny Broth*, Tabelle 2.6) wurde als Flüssigmedium zur Anzucht aerober Bakterienstämme verwendet. Dafür wurden die jeweiligen Zellen über Nacht in geeignetem Maßstab (Reagenzgläser, Erlenmeyerkolben) bei 30°C, für *Shewanella*, oder 37°C, für *E. coli*, bei 180 rpm im Schüttler inkubiert.

Tabelle 2.6 Zusammensetzung des verwendeten LB-Mediums. Dieses Flüssigmedium dient, wenn nicht anders beschrieben, zur Anzucht, d.h. zur Vorkultivierung aerober Bakterien.

Menge [g/l]	Komponente
10	Trypton
5	Hefeextrakt
5	NaCl

Je nach Bedarf wurde vor Wachstumsversuchen die benötigte Menge Antibiotika, wie z.B. Kanamycin, oder hitzelabile Komponenten steril zugesetzt.

2.2.1.2. Adaptionmedium M9 für *E. coli* K-12

E. coli wurde zur Adaption zusätzlich in einem M9 Minimalmedium mit 10 mM Na-Propionat und 10 mM Na-Butyrat kultiviert (Tabelle 2.7).

Tabelle 2.7 Zusammensetzung des M9-Minimal-Mediums.

	Menge [g/l]	Komponente
5x	30,0	Na ₂ HPO ₄
	15,0	KH ₂ PO ₄
	5,0	NH ₄ Cl
	2,5	NaCl
1x	200 ml	M9-Medium 5x
	800 ml	H ₂ O _{dd}
	10 mM	Na-Propionat
	10 mM	Na-Butyrat

Zunächst wurde eine 5-fach konzentrierte Stocklösung angesetzt, die autoklaviert bei Raumtemperatur (RT) gelagert wurde. Zur Herstellung des einfachen Mediums wurde der Stock 1:5 mit doppelt destilliertem Wasser verdünnt. Je nach Adaption- bzw. Wachstumsversuch wurden 10 mM Na-Propionat und/oder Na-Butyrat hinzugegeben.

Für die Versuche, die mit *E. coli_Δrrn_pMal_alsSD* durchgeführt wurden, wurde zusätzlich in die Vorkultur und in die Wachstumsversuche 50 μM IPTG als Induktor und 100 μM Ampicillin hinzugegeben. Diese dienen als Selektionsdruck, sodass nur Stämme, die das Plasmid tragen, kultiviert werden. Alle Wachstums- und Produktionsversuche wurden in einem Volumen von 50 ml durchgeführt.

Wurde steriles Fermentat als Medium verwendet (s. Kapitel 2.2.3 und 2.2.6), wurden die Versuche in einem Volumen von 10 ml durchgeführt.

2.2.1.3. Anaerobe Medien

Generell wurden für anaerobe Medien alle Komplementationslösungen getrennt von den Medien steril und anaerob hergestellt. Diese hitzelabil oder durch Autoklavieren ausfallenden Komponenten und Reduktionsmittel wurden komplementiert. Lösungen, wie Spurenelemente, deren Komponenten in geringen Mengen benötigt wurden, wurden als Stock-Lösungen vorbereitet und dem Medium während der Herstellung zugegeben. Die Medien wurden, soweit möglich, nach dem Einwiegen aufgeköcht, um Sauerstoff aus der Flüssigphase zu entfernen. Dafür wurden die anaeroben Kulturflaschen mit einem Gummistopfen und Lochdeckel luftdicht verschlossen, wobei über eine Kanüle während des Kochvorgangs Luft entweichen konnte, und über eine Kanüle im Anschluss, nach dem Abkühlen ohne Ausgleichskanüle, mit dem gewünschten Gas(-Gemisch) gefüllt. Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren eingestellt, danach jedoch erneut durch Probennahme gemessen und bei Bedarf über eine sterile Spritze mit anaerober, steriler NaOH- oder HCl-Lösung eingestellt.

2.2.1.4. Komplementationslösungen

Die verwendeten Spurenelemente (NB-Spurenelemente) wurden steril, wie in Tabelle 2.9 gezeigt hergestellt. Dafür wurde zunächst die Nitrilotriessigsäure in ca. 700 ml H₂O_{dd} gelöst und mit KOH auf einen pH-Wert von 6,5 eingestellt. Danach wurden alle weiteren

Komponenten hinzugegeben, mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ auf einen Liter aufgefüllt und nach dem Autoklavieren bei 4°C gelagert.

Die Komponenten der Selenit-Wolframatlösung (Tab. 2.10) wurde eingewogen und in einem Liter $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ gelöst als Stock-Lösung verwendet.

Die Komplementationslösungen, die nach dem Autoklavieren dazu gegeben wurden, waren L-Cystein (Tab. 2.8), Na-Ascorbat (Tab. 2.8), Vitamine (Tab. 2.11), CaCl_2 (Tab. 2.13) und Hefeextrakt (Tab. 2.13). Sie wurden daher steril und anaerob hergestellt. Na-Ascorbat und die Vitaminlösung wurden sterilfiltriert, wohingegen die L-Cystein- und Hefeextrakt-Lösung autoklaviert wurden. Zur Anaerobisierung wurden die Flaschen mittels Sterilfilter ($\varnothing 0,2 \mu\text{m}$) mit Stickstoff begast. Dazu wurde zyklisch, angepasst an das Gasvolumen, jedoch mindestens 20 Minuten, mit N_2 begast und Vakuum im Wechsel gezogen.

2.2.1.5. Salz-Medium für die Papier-Fermentation

Die verwendeten Salze wurden in 10-facher Konzentration in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ gelöst (Tab. 2.8). Zudem wurden für den Phosphatpuffer die zwei Komponenten, wie in Tabelle 2.8 zu sehen, ebenfalls als 10-fach Stocklösungen (je ca. 0,67 mM) hergestellt. Für ein einfach konzentriertes Medium wurden die Phosphat-Puffer-Lösungen A (KH_2PO_4) und B (K_2HPO_4) je nach pH-Wert verdünnt eingesetzt. Der pH-Wert wurde eingestellt und je 2 g/l zerkleinerte Papierhandtücher oder Holzpellets als unlösliche Kohlenstoffquellen hinzugefügt. Dadurch war ein Rührvorgang während des Aufkochens nicht möglich und daher darauf verzichtet. Ersatzweise wurden hier vor und nach dem Autoklavieren die Gasphase durch Begasen mit Stickstoff und Vakuumziehen getauscht und der gelöste Sauerstoff entfernt. Mittels Gaschromatographie (s. Kapitel 2.2.9.3) konnte die Abwesenheit von Sauerstoff durch dieses Vorgehen bestätigt werden.

Tabelle 2.8: Phosphatgepuffertes Salzmedium für die Papier Fermentation.

Komponente	Für einen Liter [g/l]	Molare Masse [mM]
	10x	
KH_2PO_4 (Lösung A 10x)	pH 6: 87,9 ml	
	pH 7: 38,8 ml	
K_2HPO_4 (Lösung B 10x)	pH 6: 12,1 ml	
	pH 7: 61,2 ml	

NH₄Cl	3	56,08
NaHCO₃	1	1,19
KCl	1	1,34
NaCl	1	17,11
CaCl₂	0,1	0,90
MgCl₂ * 6H₂O	0,1	0,49
MgSO₄ * 7H₂O	0,1	0,41
NB-Spurenelemente (Tab 2.9)	20 ml	
Selenit-Wolframat (Tab 2.10)	5 ml	

Auf den gewünschten pH-Wert einstellen, auffüllen und autoklavieren

Komplementieren:	für einen Liter	
Vitaminlösung (Tab 2.11)	10 ml	
0,2 M Na-Ascorbat	1 ml	0,2
0,5 M L-Cystein	2 ml	0,5

Lösung A (0,667 M) 90,87 g/l KH₂PO₄ (10X)

Lösung B (0,681 M) 118,76 g/l K₂HPO₄ (10X)

Tabelle 2.9 Zusammensetzung der verwendeten Spurenelemente.

Spurenelemente	Einwaage [g/l]	Molare Masse [mM]
2,14 g NTA [lösen mit KOH auf pH 6,5]		11,2 mM
MnCl₂ * 4 H₂O	0,1	0,5 mM
FeSO₄ * 7 H₂O	0,3	1,1 mM
CoCl₂ * 6 H₂O	0,17	0,7 mM
ZnSO₄ * 7 H₂O	0,2	0,7 mM
CuCl₂ * 2 H₂O	0,3	1,8 mM
AlK(SO₄)₂ * 12 H₂O	0,005	10,5 µM
H₃BO₃	0,005	80,9 µM
Na₂MoO₄ * 2 H₂O	0,11	0,5 mM
NiSO₄ * 2 H₂O	0,11	0,4 mM
Na₂WO₄ * 2 H₂O	0,2	0,6 mM

→ pH7; 1L; autoklavieren

Tabelle 2.10: Zusammensetzung der Selenit-Wolframat-Lösung.

Selenit-Wolframat (1L)	Einwaage [g]	Molare Masse [mM]
NaOH	0,5 g	
Na ₂ SeO ₃	3 mg	17 µM
Na ₂ WO ₄ * 2 H ₂ O	4 mg	12 µM

Tabelle 2.11: Die verwendete Vitaminlösung.

Vitamine	Einwaage	Molare Masse [mM]
Biotin	2 mg/l	8,1 µM
Folsäure	2 mg/l	4,5 µM
Pyridoxin-HCl	10 mg/l	48,6 µM
Thiamin-HCl	5 mg/l	14,8 µM
Riboflavin	5 mg/l	13,3 µM
Nicotinsäure	5 mg/l	40,6 µM
D/L-Ca Pantothenat	5 mg/l	10,5 µM
Vitamin B12	0,1 mg/l	0,07 µM
p-Aminobenzoensäure	5 mg/l	36,5 µM
Liponsäure	5 mg/l	24,2 µM

→ ad 1 l H₂O_{dd}

2.2.1.6. Medium zur Anzucht von *Geobacter sulfurreducens*

Für alle Versuche mit *Geobacter sulfurreducens* wurden Medien mit dem gleichen Salzstock (10x) verwendet, der in Tabelle 2.12 dargestellt ist.

Tabelle 2.12: Salz-Stock für alle *G. sulfurreducens* Versuche.

10 x Salze	Einwaage [g/l]	Endkonzentration [mM]
KH ₂ PO ₄	4,2	30,0
K ₂ HPO ₄	2,2	10,0
NH ₄ Cl	2,0	40,0
KCl	3,8	50,0
NaCl	3,6	60,0

ad 1 L H₂O_{dd}

Für das Wachstum von *Geobacter sulfurreducens* wurde ein anaerobes Medium mit 20 mM Acetat als Elektronendonator und 40 mM Fumarat oder Eisencitrat als Elektronenakzeptor hergestellt (siehe Tab. 2.13). Zunächst wurde hier der Elektronenakzeptor eingewogen und in H₂O_{dd} gelöst. Eisencitrat wurde bei Verwendung zuerst unter Aufkochen gelöst und der pH-Wert nach dem Abkühlen auf pH 7 mit 1 M NaOH hochtitriert. Im Anschluss wurden der Salzstock und alle weiteren Komponenten hinzugegeben und das Medium auf pH 7,2 eingestellt. Je nach Versuchsaufbau wurden neben Acetat ebenfalls Propionat und Butyrat zugesetzt. Nach dem Aufkochen wurden alle mit *G. sulfurreducens* verwendeten Medien direkt unter Rühren mittels Kanüle und Ausgleichskanüle mit einem Gasmix aus N₂/CO₂ (80% / 20%) begast und autoklaviert. Danach wurde das Medium mit L-Cystein, Na-Ascorbat, CaCl₂, Hefeextrakt und Vitaminen komplementiert, der pH-Wert überprüft und gegebenenfalls mit steriler, anaerober NaOH oder HCl-Lösung eingestellt.

Tabelle 2.13: Zusammensetzung des Kultivierungsmediums für *Geobacter sulfurreducens*.

Medium	Einwaage [g/l]	Molare Masse [mM] bzw Konzentration
Fe (III)⁺-Citrat	9,8 g	40,0 mM
Oder Na-Fumarat	6,4 g	40,0 mM
auf pH 7,0 einstellen		
10 x Salze (Tab. 2.12)	100,0 ml	
MgCl₂ * 6 H₂O	0,213 g	1,0 mM
NaHCO₃	1,8 g	21,0 mM
Na₂CO₃	0,5 g	5,0 mM
Acetat, Propionat, Butyrat	nach Bedarf	
Spurenelemente (Tab. 2.9)	10,0 ml	
Selenit-Wolframat (Tab. 2.10)	1,0 ml	
auf pH 7,2 einstellen		
ad 1 l H₂O_{dd}		
aufkochen, abkühlen, begasen (N₂/CO₂), autoklavieren		
komplementieren:		
Vitaminlösung (Tab. 2.11)	10,0 ml	
Hefeextrakt (10%)	10,0 ml	0,1%
0,5 M Cystein	2,0 ml	1,0 mM
0,2 M Na-Ascorbat	1,0 ml	0,2 mM
0,4 M CaCl₂ * 2 H₂O	1,0 ml	0,4 mM
auf pH 7,2 einstellen		

Als Grundlage dieses Mediums dienen die Arbeiten von Kerstin Dolch *et al.*, Coppi *et al.* und Holmes *et al.* (Coppi *et al.*, 2001; Holmes *et al.*, 2004; Dolch *et al.*, 2014).

Zur Verwendung von *Geobacter sulfurreducens* in einem bioelektrochemischen System wurden ein Anoden- und ein Kathodenmedium vom Kultivierungsmedium abgeleitet.

2.2.1.7. Anodenmedium für *Geobacter sulfurreducens*

Das Anodenmedium (Tabelle 2.14) wurde verwendet, um *Geobacter* an die Anode zu adaptieren bzw. um den Abbau von Acetat unter optimalen Bedingungen untersuchen zu können. Damit die Anode als Elektronenakzeptor fungieren konnte, wurden dem Anodenmedium im Vergleich zum Kultivierungsmedium kein Elektronenakzeptor und kein Hefeextrakt zugesetzt.

Tabelle 2.14: Anodenmedium für das bioelektrochemische System.

Medium	Einwaage [g/l]	Molare Masse [mM] bzw Konzentration
10 x Salze (Tab.)	100,0 ml	
MgCl₂ * 6 H₂O	0,213 g	1,0 mM
NaHCO₃	1,8 g	21,0 mM
Na₂CO₃	0,5 g	5,0 mM
Acetat, Propionat, Butyrat	nach Bedarf	
Spurenelemente (Tab. 2.9)	10,0 ml	
Selenit-Wolframat (Tab. 2.10)	1,0 ml	
auf pH 7,2 einstellen		
ad 1 l H₂O_{dd}		
aufkochen, abkühlen, begasen (N₂/CO₂), autoklavieren		
komplementieren:		
Vitaminlösung (Tab. 2.11)	10,0 ml	
Hefeextrakt (10%)	10,0 ml	0,1%
0,5 M Cystein	2,0 ml	1,0 mM
0,2 M Na-Ascorbat	1,0 ml	0,2 mM
0,4 M CaCl₂ * 2 H₂O	1,0 ml	0,4 mM
auf pH 7,2 einstellen		

2.2.1.8. Kathodenmedium

Das Kathodenkompartiment wurde, im Gegensatz zum Anodenkompartiment, mit Kathodenmedium (Tab. 2.15) gefüllt und abiotisch, aerob verwendet. Dafür wurde das Rezept des Anodenmediums ohne Kohlenstoffquellen und weitestgehend ohne Komplementationskomponenten, außer CaCl_2 , verwendet. Dieses Medium wurde aerob angesetzt, da in dem hier verwendeten Versuchsaufbau (s. Kapitel 2.1.7) eine sauerstoffbasierte Kathodenreaktion abläuft. Zudem wurde das Medium, wenn es wie das Anodenmedium anaerobisiert wurde, ebenfalls als Waschmedium zur Vorbereitung der Bakterienkultur auf das Bioelektrochemische System verwendet.

Tabelle 2.15: Aerob als Kathodenmedium für das Bioelektrochemische System, anaerob als Waschmedium

Medium	Einwaage [g/l]	Molare Masse [mM] bzw Konzentration
10 x Salze (Tab.)	100,0 ml	
$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,213 g	1,0 mM
NaHCO_3	1,8 g	21,0 mM
Na_2CO_3	0,5 g	5,0 mM
Spurenelemente (Tab. 2.9)	10,0 ml	
Selenit-Wolframat (Tab. 2.10)	1,0 ml	
auf pH 7,2 einstellen		
Auf 1 l mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ auffüllen und autoklavieren		
komplementieren:		
0,4 M $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1,0 ml	0,4 mM
auf pH 7,2 einstellen		

Zur Kultivierung wurde zunächst eine Kryokultur (1-1,5 ml; siehe Kapitel 2.2.2. Herstellung von Kryokulturen) aufgetaut und zu 9 ml des *Geobacter*-Mediums in ein Hungate gegeben und für ca. 48 h bei 30°C stehend mit N_2/CO_2 Gasphase inkubiert. Je nach Versuchsvolumen wurde die Kultur im Anschluss in Anaerobflaschen (N_2/CO_2) mit einem größeren Volumen überführt (200 ml bis 1 l). Diese Kultur wurde wieder für mindestens 48 h bei 30°C stehend bis zum Versuchsstart und einer ausreichenden Zellzahl inkubiert.

2.2.2. Herstellung von Kryokulturen

Um Mikroorganismen und deren Kulturen konservieren zu können, wurden diese bei -80°C gelagert. Je nachdem konnten sie dadurch nach Monaten oder Jahren wieder verwendet werden.

Für die Kryo-Konservierung wurde eine Zell-Kultur in der exponentiellen Phase zunächst bei 6000 g und 4°C für 5 min abzentrifugiert (Haraeus Multifuge X1R, Thermo Scientific) und in der gleichen Menge des jeweiligen Kulturmediums wieder aufgenommen. Die 2 ml -Kryogefäße wurden mit maximal $1,5\text{ ml}$ Kultur und sterilem, bei Bedarf anaerobem, Glycerin (Endkonzentration 10%) versetzt. Im Anschluss wurde die gewaschene Kultur steril dazu gegeben. Durch Schockfrieren der Kultur in flüssigem Stickstoff, wurde Kristallbildung vermieden und die Kultur konnte bei -80°C gelagert werden.

2.2.3. Aufbau der Papierfermentation

Der erste Schritt in der Nutzbarmachung von cellulosehaltiger Biomasse stellte der Fermentationsschritt dar. Für alle Ansätze wurde eine Trockenbiomasse von $2\% \text{ w/v}$ gewählt. Die in den ersten Versuchen getesteten Holzpellets wurden eingewogen und fielen während der Herstellung des anaeroben Fermentationsmediums (Tabelle 2.8) auseinander, sodass Holzstücke in der Größenordnung bis zu 50 mm entstanden. Das Toilettenpapier und die Papierhandtücher (ebenfalls 20 g/l) wurden mit einem Aktenvernichter in Streifen geschnitten und im Anschluss mit einer elektrischen Kaffeemühle (Kaffeemühle PETRA Typ M 85.00, Petra Deutschland GmbH, Ense) in Etappen zerkleinert und in Schottflaschen gefüllt. Das anaerobe Medium wurde, wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, angesetzt. Da die Ausbeute und Effizienz der Fermentation beleuchtet werden soll, wurde je nach Versuchsaufbau der pH-Wert auf 5 , 6 oder 7 eingestellt, die Gasphase mit H_2/CO_2 ($80\% / 20\%$) oder N_2 verwendet. Die Fermentationsansätze wurden von 200 ml bis zu 2 L sukzessive erhöht, wobei für die Vergleichsversuche zum Einfluss der Gasphase ein $1:2$ Verhältnis von Flüssig- zu Gasphase gewählt wurde.

Alle Versuche wurden mit $10\% \text{ (v/v)}$ inokuliert. Für die Anfangskultur war dies ein Mix aus verschiedenen Abwasserzuläufen der Klärwerke Neureut, der EmscherGenossenschaft in Dinslaken und einer Denitrifizierungsanlage unseres Labors. Für alle weiteren Versuche wurde jeweils aus den laufenden Ansätzen eine gemischte Probe zur Inokulierung genutzt. Alle

Versuche wurden in Schottflaschen durchgeführt, da ein getesteter Fermenter der Firma Infors (Infors AG, Bottmingen, Schweiz) nicht ausreichend sauerstofffrei gehalten werden konnte.

Während der Fermentation wurde regelmäßig im Abstand von drei Tagen eine Probe entnommen, der pH-Wert sofort überprüft und gegebenenfalls mit sterilen und anaeroben Lösungen eingestellt. Entsprechend des Versuchsaufbaus wurde der Einfluss des pH-Werts (5, 6 oder 7) untersucht. Zudem wurden der Gesamtkohlenstoffgehalt (über TOC Analyse) und der Gehalt an organischen Säuren via Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) analysiert.



Abbildung 12: Die Fermentation wurde in laborüblichen Schottflaschen mit Anaerobverschluss durchgeführt. Exemplarisch ist hier ein 2-L-Versuch gezeigt. Als 2% (w/v) Biomasse wurden Papierhandtücher, wie links im Bild zu sehen, zerkleinert und mit dem Fermentationsmedium anaerobisiert.

Nachdem der Versuch abgeschlossen war, wurde das sogenannte Fermentat geerntet. Dazu wurde ein Volumen von bis zu einem Liter abgenommen und die Cellulose durch mehrere Filtrationsschritte entfernt. Zunächst wurde das Fermentat abzentrifugiert und anschließend über einen Papierfilter filtriert, um Fasern bis zu etwa 15 μm abzutrennen. Danach wurden Glasfaserfilter (\varnothing 90 mm, Sartorius AG, Göttingen) absteigend der *cut off* Größe von 1 μm , 0,7 μm und 0,2 μm verwendet. Diese wurden in einen Keramiklochtrichter gelegt oder angepasst und mittels Kolben mit einer Vakuumpumpe filtriert. Bei Bedarf wurden die Filtrationsschritte mit neuen Filtern wiederholt. Das Fermentat wurde weitergehend steril oder unsteril in BES getestet oder für Wachstumskurven genutzt.

2.2.4. Bioelektrochemisches System (M3C)

Im Anschluss des Fermentationsprozesses sollte das abgenommene und filtrierte Fermentat steril als Substrat in einem BES spezifisch abgereinigt werden. Dafür wurden neben *Geobacter sulfurreducens* als exoelektrogener Modelorganismus auch Perkolat getestet, um spezifisch eine oder mehr organische Komponenten gezielt unter Stromproduktion abzubauen. Zudem wurde der Fermentationsansatz unsteril hinsichtlich enthaltener exoelektrogener MO getestet. Dazu wurde unsteriles Fermentat vom laufenden Versuch abgenommen und in BES-Systemen getestet.

Je nach Versuchsaufbau wurde die *Geobacter*-Vorkultur in Anaerobmedium vorkultiviert. Die BES wurde aufgebaut und steril vorbereitet. Vor dem Versuchsbeginn wurde eine ausreichend dicht gewachsene *Geobacter*-Kultur bei 6.000 rpm für 10 min abzentrifugiert. Die Flüssigphase wurde verworfen und als Waschschrift, u.a. zur Entfernung von Elektronenakzeptoren, das Pellet in etwa 50 ml sterilem Kathodenmedium resuspendiert und bei 6.000 rpm für 10 min abzentrifugiert. Wiederum wurde der Überstand verworfen und das Pellet in wenig Anodenmedium resuspendiert. Die optische Dichte dieser Lösung wurde bestimmt und eine vorbereitete Flasche mit Anodenmedium, steril und mit N₂/CO₂ als Gasphase, auf eine OD_{600 nm} von 2 inokuliert.

Das bereits beschriebene Biogas-Konsortium (Perkolat) wurde als Inokulum verwendet. Dazu wurde etwa ein Liter Perkolat, das zuvor bei -80°C gelagert wurde, aufgetaut. Das Perkolat wurde bis zu 100 µm gefiltert bezogen. Vor der Verwendung wurde es in Anaerobflaschen anaerobisiert durch mehrmaliges, abwechselndes Begasen mit Stickstoff und Vakuumziehen. Im Anschluss wurde es als Vorkultivierung der Anode in die BES eingefüllt.

Alle Anoden-Kultivierungen wurden für etwa zwei Wochen bis zu einer stabilen Stromproduktion, jedoch nur so lange noch Elektronendonator vorhanden war, durchgeführt. Jede BES wurde dazu, wenn nicht anders angegeben, kontinuierlich mit N₂/CO₂ (80%/20%) durch Begasung der Gasphase anaerob gehalten.

Vor jedem Lauf wurde das zum Autoklavieren eingefüllte Wasser durch Kathodenmedium im Kathodenkompartiment ausgetauscht und die jeweilige Kultur unter Nutzung einer Sterilbank (HeraSafe, Heraeus; Hanau) ins Anodenkompartiment eingefüllt. Nachdem die Ag/AgCl-Referenzelektrode mittels Voltmeter auf ihre Messgenauigkeit hin überprüft wurde mittels Voltmeter, wurde diese durch UV-Licht sterilisiert in den Deckel des BES installiert. Als erstes wurde die Begasung über eine lange Kanüle und einen Sterilfilter ins Innere des

Anodenmediums eingebaut und ein Gasstrom über einen Verteiler konstant eingestellt. Zusätzlich wurde eine Ausgleichskanüle hier und ins Kathodenkompartiment gesteckt, um einen Druckausgleich bzw. die Luftzufuhr zu gewährleisten. Nachdem alle Elektroden angeschlossen waren, wurde das gewünschte Programm des Mehrkanalpotentiostat 6 EmStat3 (PalmSens BV, Randhoeve, Niederlande) gewählt. In allen Chronoamperometrie-Versuchen wurde ein Potential von -199 mV (~ 0 mV vs. NHE) gewählt. Für einen Vergleichsversuch wurde die Methode des *open circuit potential* genutzt. Dabei handelt es sich in dieser Arbeit um einen parallel gleich aufgebauten Versuch, bei dem ebenfalls -199 mV gegen Ag/AgCl-Elektrode gewählt wurde. In den Stromkreis wurde statt einem Stromabnehmer ein theoretisch unendlich großer Widerstand eingebaut. Dadurch kann kein Strom fließen und die Reaktionen in dem bioelektrochemischen System finden ohne Elektronenakzeptor statt.

Die eigentlichen Versuche wurden im Anschluss, wie beschrieben, bei 30°C durchgeführt, bis eine Abnahme der Stromkurve bzw. ein Abbau der organischen Komponenten von Interesse zu detektieren war. Dafür wurde regelmäßig etwa 1 ml Probe mittels Spritzen genommen. Diese wurden zur Analyse über 0,2 μm Spritzenvorsatz-Filter (PTFE, VWR, Darmstadt) filtriert und mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, Kapitel 2.2.9.1) hinsichtlich der beinhalteten organischen Säuren analysiert. Zudem wurde der pH-Wert überprüft und gegebenenfalls mit steriler, anaerober NaOH- oder HCl-Lösung eingestellt, sodass in allen Versuchen ein mittlerer pH-Wert von 7 gehalten wurde.

2.2.5. Berechnung der Coulomb-Effizienz

Um den Wirkungsgrad einer Brennstoffzelle anzugeben, wird die Coulomb - Effizienz errechnet. Dafür muss bekannt sein, wie viele Elektronen in den Substraten des Mediums steckt. Hier sind die Kohlenstoffverbindungen von Interesse. Theoretisch wird angenommen, dass alle C - Atome zu CO_2 umgewandelt werden. Die frei werdenden Elektronen dieser Reaktion werden in [mmol] umgerechnet. Über die Avogadro - Konstante ($N_A = 6,022 \cdot 10^{23} \cdot \text{mol}^{-1}$) multipliziert wird die Teilchenzahl erhalten. Wiederum multipliziert mit der Elementarladung eines Elektrons ($e = 1,602 \cdot 10^{-19}$) wird der theoretisch maximale Coulomb - Wert [= A/s] errechnet. Multipliziert mit der Verweildauer des Mediums oder normalisiert auf das Versuchsvolumen kann die theoretische Stromstärke errechnet werden, die in Relation zur tatsächlich gemessenen gesetzt werden kann. Zudem wurde davon

ausgegangen, dass durchschnittlich pro Mol organischem Kohlenstoff 4 Mol Elektronen frei wurden, wenn diese bis zu CO₂ oxidiert wurden.

Zunächst wurde der gemessene Strom auf die Elektrodenfläche normiert, sodass die mittlere Stromdichte erhalten wird:

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

Die biologisch zugängliche Anodenfläche des hier verwendeten Graphitvlieses betrug 36 cm². Um die tatsächlich auf die Anode übertragenen Elektronen mit den durch Abbau von Kohlenstoffverbindungen freiwerdenden Elektronen in ein Verhältnis setzen zu können, wurden zunächst die übertragenen Elektronen berechnet. Dies wurde mit Hilfe des Programms Origin durchgeführt. Dazu wurde die Stromdichte über die Zeit integriert und die 4 Elektronen, die theoretisch pro Kohlenstoffmolekül frei wurden, mit der Elementarladung e und der Avogadro-Konstante N_A verrechnet:

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

Die frei werdenden Elektronen wurden durch die Abnahme des TOC oder der spezifischen organischen Säure errechnet. Im zweiten Fall werden die frei werdenden Elektronen der Menge angepasst, die durch Abbau der Säure zu CO₂ frei werden. Der TOC wird in g/l angegeben, M ist die molare Masse des Kohlenstoffs von 12 g/mol und das Volumen V des Anodenkompartiments waren hier 0,270 l.

$$n [\text{TOC}] = \frac{\Delta \text{TOC}}{M} * V$$

Im letzten Schritt wurden die über die Elektrode gemessenen und aufgenommenen Elektronen gegen die frei gewordenen Elektronen ins Verhältnis gesetzt und mit 100 multipliziert, um die Coulomb-Effizienz in % zu erhalten.

$$\text{Coulomb-Effizienz [\%]} = \frac{n[C]}{n[\text{TOC}]} * 100$$

2.2.6. Berechnung des Kohlenstoffgehalts der Gasphase

Vor der Messung der Zusammensetzung der Gasphase in den Fermentationsversuchen über einen Mikro-GC, wurde die Gasphase auf 0,5 bar aufgefüllt. Damit war es möglich die Ansätze auch während der Messung und der Probennahme anaerob zu halten. Zudem musste ein definierter Druck zur Errechnung der Kohlenstoffmenge in der Gasphase vorhanden sein. Die

gemessenen Gase wurden in vol% angegeben. Die Gesamtgasphase waren 400 ml. Zunächst wurde der Anteil der Gase in ml umgerechnet. Unter H₂/CO₂-Atmosphäre wurden vom gemessenen CO₂-Wert der durch die Begasung enthaltene Wert abgezogen:

$$\text{CO}_2 [\text{vol}\%] = \text{CO}_2_{\text{gemessen}} - 20 \text{ vol}\%$$

Im Anschluss wurden die Masse der Gase durch Umstellen der Formel für ideale Gase errechnet $pV=nRT$. Durch die eingestellten Bedingungen wurde die Formel umgestellt:

$$m = \frac{p \cdot V}{R \cdot T} \cdot M$$

Die Fermentationsbedingungen waren 30°C und 0,5 bar. Alle Größen wurden in SI-Einheiten umgerechnet.

Für Methan:

$$m = \frac{15000 [\text{Pa}] \cdot \left(\frac{V [\text{ml}]}{1000000} [\text{m}^3] \right)}{8,314 \left[\frac{\text{J}}{\text{mol} \cdot \text{K}} \right] \cdot 303,15 [\text{K}]} \cdot 16,04 \left[\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right]$$

Für Kohlendioxid:

$$m = \frac{15000 [\text{Pa}] \cdot \left(\frac{V [\text{ml}]}{1000000} [\text{m}^3] \right)}{8,314 \left[\frac{\text{J}}{\text{mol} \cdot \text{K}} \right] \cdot 303,15 [\text{K}]} \cdot 44,01 \left[\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right]$$

2.2.7. Crossflow Filtration und Nanofiltration

Nach der Fermentation und bei Bedarf nach der M3C wurde das Fermentat abgenommen und für weiterführende Versuche partikelfrei filtriert. Dazu wurde neben Glasfaserfiltern, die gegebenenfalls zusätzlich mit Vakuum verwendet werden konnten, eine Crossflow-Anlage (0,2 µm, mPES MidiKros® Filter Module D02-E001-05-S, KR2i TFF-System, SpectrumLabs, Breda, Netherlands) verwendet. Hierbei wurde die zu filtrierende Lösung im Kreis durch gebündelte Kapillare geleitet. Dabei wurde die Flüssigkeit rechtwinklig zur Flussrichtung durch die Kapillarwand, in diesem Fall 0,2 µm, filtriert. Diese halbautomatisierte Filtrationstechnik wurde verwendet, wenn eine Lösung schwer filtrierbare Stoffe enthielt.

Bei der Umkehrosmose können aus einer Lösung, auch durch den höheren Druck (>7 bar), mehr Komponenten entfernt werden, sodass voll entsalztes Wasser generiert werden kann. Allerdings beeinflussen auch Komplexbildungen mit Salzen den Rückhalt und die Adsorption

an der Membran. Daher wurde im Vorfeld die Zusammensetzung des Fermentats im Rahmen einer Bachelorarbeit am Institut für Wasserchemie und Wassertechnologie des KIT analysiert.

Nach dem Schritt des M3C wurde das Fermentat bis zu 0,7 µm partikelfrei filtriert und autoklaviert. Im Anschluss wurde dieses für einen Nanofiltrationsversuch verwendet.

Die hier verwendeten Membranen (Dow Filmtec, NF90 oder NF270, Steritech, USA) wurden bei einem Druck von 4,5 bar in einer 350 ml Rührzelle (Amicon, Merck Millipore, Germany) getestet. Dabei wurde N₂ zum Druckaufbau verwendet, um das System anaerob zu halten.

Nach den Filtrationsschritten wurde der Gehalt an organischen Säuren mittels HPLC überprüft und ggf. für weitere Versuche der pH-Wert eingestellt, falls die abfiltrierten Substanzen diesen beeinflussten.

2.2.8. Produktion von Plattformchemikalien

Das nach den Versuchen in der M3C sterile und gefilterte und ggf. ankonzentrierte Fermentat wurde als Kultivierungsflüssigkeit eingesetzt. Vor allem die beinhalteten organischen Säure(n) wurden als Substrat für MO getestet. Das Wachstum in Fermentat, aerob mit *Shewanella oneidensis* und anaerob mit *G. sulfurreducens*, wurde untersucht. Zusätzlich wurde ein *E. coli* K12 mit und ohne zusätzliches Plasmid, welches die Gene zu Acetoin-Produktion trägt, verwendet.

2.2.8.1. Wachstum von *Shewanella oneidensis* und *Geobacter sulfurreducens* in Fermentat

Shewanella oneidensis wurde in 25 ml LB über Nacht bei 30°C und 190 rpm schüttelnd als Vorkultur inkubiert. Die gezeigten Wachstumskurven wurden mit einer Start-OD_{600nm} 0,05 begonnen. Als Positivkontrolle wurde ein PBS-Medium mit je 30 mM Acetat, Propionat und Butyrat und 0,1% Hefe gewählt. *Shewanella oneidensis* wurde in Fermentat +/- 0,1% Hefeextrakt getestet. Als Zeitraum wurde etwa 30 h gewählt, überprüft wurden anschließend pH-Wert, OD und organische Säuren via HPLC. Ab einer OD_{600 nm} von 0,5 wurden die Proben auf dem Photometer verdünnt gemessen.

Für *G. sulfurreducens* wurde der Versuchsaufbau ähnlich dem mit *S. oneidensis* gewählt, nur anaerob. Als Positiv-Kontrolle wurde das Kultivierungsmedium mit 30 mM Acetat, Propionat

und Butyrat verwendet und das Fermentat vor Verwendung steril in Anaerobflaschen mit einer N₂/CO₂-Gasphase überführt.

Escherichia coli K-12 wurde zunächst über Nacht in LB angezogen. Alle Wachstumsversuche wurden in 50 ml entsprechendem Medium bzw. Fermentat bei 37°C, 190 rpm schüttelnd, mit einer OD_{600 nm} von 0,1 aerob durchgeführt. Um das Wachstum und den Abbau von Propionat zu untersuchen, wurde zunächst M9 Medium mit 20 mM Na-Propionat und Na-Butyrat verwendet. Dieses Medium wurde weiterhin für eine Adaptationsreihe von *E. coli* mit Propionat genutzt, indem nach jeweils drei Tagen wieder 1:10 in frisches Medium überimpft wurde. Für weitere Wachstumsuntersuchungen in Fermentat als Substrat wurde das Wachstum in M9 Medium als Positiv-Kontrolle parallel durchgeführt.

Daneben wurde untersucht, ob das Wachstum des *E. coli* K12-Stamm als Wildtyp und durch Deletion des *rnr*-Gens und Einbringen eines Plasmids (pMal mit *alsS* und *alsD*) beeinflusst wird. Zusätzlich wurde der Einfluss einer Adaption des *E. coli* auf Propionat als Substrat getestet, indem bis zu sechs Generationen in M9-Medium mit Propionat kultiviert wurden.

2.2.9. Molekularbiologische Methoden

2.2.9.1. Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Bakterienzellen

Die genomische DNA von Stämmen, wie *Geobacter sulfurreducens* oder *E. coli*, wurde mit dem Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Mannheim) nach Herstellerangaben isoliert. Dabei werden die Zellen lysiert, RNA degradiert, Proteine und gDNA gefällt und die DNA im letzten Schritt rehydriert.

2.2.9.2. Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmiden, wie pMal_alsSD, aus Bakterienzellen erfolgte mithilfe des Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Mannheim). Dafür wurden die Zellen einer 10 ml Übernachtskultur zunächst abzentrifugiert und das Pellet mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen, um die DNA freizusetzen. Anschließend wurde die genomische DNA durch Neutralisation des pH-Wertes gefällt und abzentrifugiert, während die Plasmid-DNA stabil im Überstand verblieb. Diese Plasmid-DNA konnte an die Säulenmatrix der Kit-Silica-Säulen binden. Verunreinigungen wurden in einem Waschschrift mit Ethanol ausgewaschen. Mit destilliertem Wasser wurde die Plasmid-DNA anschließend von der Säule gespült. Anschließend wurde die Konzentration der Plasmid-DNA via NanoDrop gemessen und konnte je nachdem für PCR Analysen und zusätzlich über Sequenzierung überprüft werden und/oder in einem nachfolgenden Klonierungsschritt genutzt werden. Die Plasmide wurden bei -20 °C gelagert.

2.2.9.3. DNA-Isolierung von Flüssigkulturen

Um DNA einer Flüssigkultur zu erhalten wurde eine Übernachtskultur bei 6000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert (Beckman Coulter Avanti J-26 XP). Das Pellet wurde in PBS-Medium aufgenommen und im Anschluss für 15 min bei 95°C und 300 rpm im Thermomixer (Thermomixer Compact, Eppendorf) erhitzt, wodurch die Zellen zusätzlich aufgeschlossen werden sollen. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml-Reagiergefäß überführt und für 5 min bei 16.000 rpm abzentrifugiert (Centrifuge 5418, Eppendorf). Der Überstand jeder Probe wurde, den Herstellerangaben folgend, auf je einen Pre-Filter gegeben und weiterhin nach

Protokoll verfahren (InnuPREP Stool DNA Kit; Analytik Jena). Am Ende des Protokolls wurde in 30-100 µl H₂O_{dd} eluiert, je nach erwarteter DNA-Konzentration, und die DNA bei 4°C gelagert.

2.2.9.4. PCR (Polymerasenkettenreaktion)

Während einer Polymerase - Kettenreaktion (englisch *polymerase chain reaction* - PCR) werden variable DNA - Fragmente mittels einer hitzestabilen DNA-Polymerase amplifiziert. Dadurch können Gene und DNA - Sequenzen vervielfältigt, Mutanten generiert und Klonierungen kontrolliert werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer (Oligonukleotide) sind unter Materialien in Tabelle 2.15 aufgelistet. Für die im Thermocycler (C1000, S1000, MJ-Mini, Biorad, München) durchgeführten analytischen Kontrollen, bzw. Vergleiche von DNA - Sequenzen, wurde ein „*ready to use*“ MangoMixTM Bioline (Luckenwalde) verwendet, der bereits eine Taq - Polymerase, dNTPs und MgCl₂ beinhaltet. Der Taq - Polymerase fehlt jedoch die 5' → 3' Exonukleaseaktivität. Zur Herstellung von zur Klonierung eingesetzten DNA - Fragmenten, wurde die iProof - Polymerase (BioRad, München) verwendet, die über eine „*proof reading*“ Funktion verfügt. Die Zusammensetzung der PCR - Ansätze ist in Tabelle 2.16 dargestellt. Die zu untersuchende DNA wurde entweder durch ein in Kapitel 2.2.5.1 beschriebenes KIT aufgereinigt oder als Kolonie-PCR über einen 10-minütigen Aufkochvorgang bei 95°C aus den Zellen gewonnen. Die PCR von Klonen mittels PCR ist eine Methode, um mehrere Klone auf einmal zu untersuchen und zu charakterisieren (Güssow *and* Clackson, 1989). Hierbei wurden die Bakterienkolonien einzeln mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und auf einer Agar-Platte ausgestrichen. Die verbleibenden Zellen wurden anschließend direkt im PCR-Reaktionsansatz mit MangoMix, oder bei größeren Fragmenten (> 3,5 kb) im Phusion Mastermix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) resuspendiert.

In Tabelle 2.17 ist das Standardprotokoll für alle PCR - Reaktionen, die benutzt wurden, aufgezeigt. Als Denaturierungstemperatur wurden 95°C für die Taq - Polymerase eingestellt. Die Annealingtemperatur wurde entsprechend der optimalen Anlagerungstemperatur des jeweiligen Primerpaares und die Elongationszeit abhängig von der zu erwarteten Größe des PCR – Produkts gewählt.

Zur Sicherung der untersuchten Kolonien werden diese parallel auf einer geeigneten Platte, wie LB mit Antibiotika oder anderen Zusätzen, ausgestrichen und je nach Wachstumsoptimum kultiviert. Für einen analytischen PCR Reaktionsansatz werden wie in Tabelle 2.16 gezeigt je 7,5 µl MangoMix (2x) mit Primern und der zu untersuchenden DNA auf ein Gesamtvolumen

von 15 µl angesetzt. Wenn der PCR-Ansatz im Anschluss für weitere Klonierungen oder für die IlluminaSeq® verwendet wurden, wurde die PCR mit der iproof-Polymerase mit einem Volumen von 30-50 µl hergestellt (in Tabelle 2.16 für 50 µl). Die verwendeten PCR-Programme sind in Tabelle 2.17 und die verwendeten Primer in Tabelle 2.4 (Bakt_341F/Bakt_805R für Bakterien und A519F/A906R für Archaeae) dargestellt. Alle Primer wurden in einer Konzentration von 2 pmol eingesetzt.

Während des Fermentationsvorgangs sollte überprüft werden, ob neben den über Illumina-Sequenzierung und FISH überprüften Bakterien und Archaeae auch Pilze vorhanden sind. Dazu wurde eine Referenz-Pilz-Kultur aus einer Laborkultur in LB-Medium aerob wachsen gelassen. Die Fermentationsansätze für die Illumina-Sequenzierung wurden jeweils zweimal zusammen isoliert, sodass zweimal 10 ml Fermentatmix zur DNA-Isolation verwendet werden konnte. Diese wurden bei 9.000 rpm abzentrifugiert, mit 500 µl TE-Puffer (Tris und EDTA zur DNA-Lagerung) gewaschen und in Eppendorf Gefäße überführt. Nach erneutem Abzentrifugieren für 5 min wurde der Überstand verworfen und es wurde mit 300 µl Extraktionspuffer resuspendiert. Die Proben wurden mechanisch über einen Potter aufgeschlossen. Nach Zugabe von jeweils 150 µl Na-Acetat wurden die Proben zunächst für 10 min bei -20°C eingefroren und danach für 5 min abzentrifugiert. Die DNA befand sich dadurch im Überstand. Nach Zugabe des gleichen Volumens an Isopropanol, wurden die Proben für 5 min bei RT inkubiert. Das im Anschluss abzentrifugierte Pellet ist die DNA, die nochmals mit 70% EtOH gewaschen wurde. Die so isolierte DNA wurde als template für iproof-PCR Reaktionen benutzt.

Tabelle 2.16: Die PCR-Pipettierschemata der verwendeten Reaktionen.

Analytische PCR	Präparative-PCR (iProof)	Phusion-PCR für IlluminaSeq®
7,5 µl 2xMangoMix (inkl. Polymerase)	10 µl 5X iProof-Puffer	10 µl 5x Phusion HF Buffer
3,75 µl forward Primer (2 pmol/µl)	12,5 µl forward Primer	1 µl dNTPs (10 mM)
3,75 µl reverse Primer (2 pmol/µl)	12,5 µl reverse Primer	2,5 µl forward Primer (10 µM)
1 µl DNA-Lösung/Klon	1 µl iProof-Polymerase	2,5 µl reverse Primer (10 µM)
	1 µl dNTPs (10 mM)	1 µl DNA-Lösung/Klon
	1,5 µl DMSO	1,4 µl DMSO (optional)
	11,5 µl H ₂ O _{dd}	0,5 µl Phusion DNA Polymerase
	1 µl DNA-Lösung /Klon	Mit H ₂ O _{dd} auf 50 µl auffüllen
15 µl Gesamtvolumen	50 µl Gesamtvolumen	50 µl Gesamtvolumen

Tabelle 2.17: PCR-Programm für den MangoMix-, iproof- und phusion-PCR-Ansätze.

	MangoMix		Iproof		
	Temperatur	Dauer	Temperatur	Dauer	
initiale Denaturierung	95°C	5:00 min	98°C	5:00 min	
Denaturierung	95°C	0:30 min	98°C	0:30 min	} 30-35x
Primer-Binding	55-60°C	0:30 min	55°C	0:30 min	
Polymerase Aktivität	72°C	1 min/kb	72°C	0:30 min/kb	
Elongation	72°C	10:00 min	72°C	10:00 min	
Kühlen	12°C	∞	12°C	∞	

2.2.9.5. Isolierung und Aufreinigung von DNA aus einem Agarosegel oder PCR-Ansatz

DNA-Fragmente, die mittels PCR amplifiziert wurden oder durch einen Restriktionsansatz entstanden sind, wurden zunächst auf ein 1%-iges Agarosegel geladen, um die Fragmentlänge des Amplifikats zu detektieren und dadurch gegebenenfalls erste Rückschlüsse auf die Sequenz schließen zu können. Durch die Nutzung von MidoriGreen, welches sich in die DNA-Stränge interkaliert, wurden diese unter UV-Licht sichtbar und die Banden von Interesse konnten mittels Skalpell ausgeschnitten werden. Diese Gelstücke konnten anschließend mit dem Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Mannheim) gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt werden. Vergleichbar zur DNA-Aufreinigung des Miniprep-Kits (2.3.3) wurde auch hier die DNA an eine Silica-Säule gebunden und Verunreinigungen durch Waschen mit Ethanol entfernt. Falls die Ansätze direkt, ohne Gel, verwendet wurden, konnte das beschriebene Kit ebenfalls verwendet werden, um die Polymerasen, Salze, Enzyme u.a. zu entfernen.

2.2.9.6. Bestimmung der Konzentration genomischer DNA

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration einer Probe wurden von dieser 1-2 µl mittels Photometer (Spectrophotometer Nanodrop 2000, Thermo Scientific) bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Über den Quotient der bei 260 nm und 280 nm gemessenen Absorptionen konnte die Reinheit der DNA bestimmt werden. Das Absorptionsmaximum von aromatischen Aminosäuren und damit auch Proteinen liegt bei 280 nm. Wurde ein Quotient von $\geq 1,8$ erreicht, lag eine reine DNA-Lösung vor. Lag dieser darunter, konnte davon ausgegangen werden, dass sich in der Probe noch Proteine befanden.

2.2.9.7. Transformationstechniken

Herstellung elektrokompenter Zellen

Zur Transformation wurden zunächst elektrokompente Zellen hergestellt. In dieser Arbeit wurde der bereits im Labor etablierte *E. coli* K12_Δ*rnr* verwendet. Dazu wurden die Zellen über Nacht in salzarmem SOB-Medium (pro L: 20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,58 g NaCl, 0,19 g KCl) inkubiert und am nächsten Tag in 50 ml SOB bis zu einer OD_{600 nm} von 0,6 kultiviert. Im Anschluss wurde das Wachstum auf Eis gestoppt. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 6.000x g und 4°C für 5 min wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet mindestens zweimal mit kaltem H₂O_{dd} gewaschen, um die verbliebenen Salze zu entfernen. Entweder wurden die Zellen sofort verwendet oder mit sterilem Glycerin (1:10) versetzt bis zu einem Monat bei -80°C gelagert und dann verwendet.

Transformation

Um DNA in eine Zelle einzubringen, wird diese transformiert. Dabei können unterschiedliche Verfahren verwendet werden. In dieser Arbeit wurde eine Elektroporation durchgeführt, bei der durch einen kurzen Stromimpuls Löcher in der Cytoplasmamembran erzeugt wurden und so die DNA aus der umgebenden Lösung aufgenommen werden konnte. Die Ligationsansätze oder Plasmide wurden zunächst dialysiert, um wie auch bei den elektrokompenten Zellen, die Salze aus der Lösung zu entfernen. Je 1 µl des Transformationsansatzes wurde zu 100 µl kompetenten Zellen pipettiert und diese in eine gekühlte, sterile Elektroporationsküvette gefüllt. In einem Elektroporationsgerät (*E. coli*-Pulser, Bio-Rad, München) wurden die Zellen für 5 ms einer Spannung von 1,8 kV ausgesetzt. Direkt im Anschluss wurde der Ansatz in 900 µl auf 37°C erwärmtem SOC-Medium (47,2 ml SOB (s.o.), 1 ml MgCl₂, 1,8 ml 40%ige Glucose) aufgenommen und bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Danach wurde die Suspension auf geeigneten Agarplatten (z.B. mit Antibiotika) ausgestrichen.

2.2.9.8. FISH (Fluoreszenz-*in-situ* Hybridization)

Bei der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung können Zellen direkt und in ihrer ursprünglichen Position („*in situ*“) in biologischen Proben gezielt sichtbar gemacht werden. Dadurch können vor allem Mischkolonien hinsichtlich ihrer Komposition untersucht werden. In dieser Methode

wurde die Hybridisierung zweier einzelsträngig vorliegender Nucleinsäuren zu einem Doppelstrang genutzt. In den meisten Fällen binden DNA-Sonden spezifisch an die an charakteristisch rRNA-Bereiche (5S, 16S oder 23S rRNA). Diese Sonden sind künstlich hergestellte Oligonukleotide, die an solche spezifische Bereiche binden und an deren 5'Ende ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Bindet eine solche Sonde mit der ihr komplementären rRNA oder DNA, wird diese über die Fluoreszenzfarbstoffe mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar. Wenn unterschiedliche Farbstoffe genutzt werden, können spezifisch unterschiedliche Bakterien-, Archaea- oder andere Zellen detektiert werden, je nach Wahl der Zielsequenz. In dieser Arbeit wurde die 16S rRNA als konservierte Zielsequenz genutzt, da diese in jeder Bakterienzelle mehrfach vorhanden ist und somit ein starkes Signal zu erwarten ist (DeLong *et al.*, 1989). Die verwendeten Sonden sind in Tabelle 2.6 (Kapitel 2.16) dargestellt. Um eine haltbare Kultur mit Fluoreszenz-Sonden zu generieren, werden diese fixiert, immobilisiert, permeabilisiert, mit einer oder mehreren Sonden hybridisiert und mehrfach gewaschen.

Fixierung

Damit die Zellen ihre Morphologie und Lokalisation beibehalten, wurde zu Beginn ein Fixierungsschritt durchgeführt. Dazu wurden die Zellen und deren Moleküle chemisch über Formaldehyd vernetzt. Die Aldehydgruppe interagiert dabei mit der Aminogruppe und bildet Quervernetzungen. Für die Fixierung von Flüssigproben wurden 2 ml der zu untersuchenden Probe für mindestens zwei Minuten bei 16.000 rpm abzentrifugiert und mit dem gleichen Volumen Fixierlösung (Tab. 2.18) aufgenommen.

Tabelle 2.18: Zusammensetzung von 10x PBS und der Fixierlösung des FISH.

10x PBS		Fixierlösung	
NaCl	40 g	10x PBS	10 ml
KCl	1 g	37%-iges Formaldehyd	10,8 ml
Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	3,82 g	H ₂ O _{dd}	79,2 ml
KH ₂ PO ₄	1 g		
pH	7,5		
H ₂ O _{dd}	500 ml		

Nach einer Fixierungszeit von 1 h bei 4°C wurden die Zellen erneut für 2 min bei 16.000 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und in 1x PBS aufgenommen (Tab. 2.18). Nach

zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in 1x PBS/100% EtOH (50/50, v/v) aufgenommen. Bei Bedarf konnten die Proben so bei -20°C gelagert werden (Amann *et al.*, 1990).

Immobilisierung

Die Proben wurden auf dafür geeignete Glas-Slides (Diagnostic Microscope Slides, ER-201B-CE24, 8 Well 6 mm *numbered*; Thermo Scientific; Portsmouth, USA) aufgebracht und analysiert. Dazu wurden 10 µl der fixierten Kultur je in ein Well pipettiert und bei 37°C getrocknet. Zur Immobilisierung auf dem Slide wurden die Proben mit 0,1% *low melt* Agarose in 1 x PBS überschichtet und wiederum getrocknet. Danach konnten die Proben bei 4°C gelagert werden.

Dehydrierung und Permeabilisierung

Über eine aufsteigende Ethanol-Reihe wurden die Proben dehydriert. Von 50% über 80% zu 100% EtOH wurde das Wasser entzogen und im Anschluss bei 37°C getrocknet. Damit die eingesetzten Sonden effektiver in die Zellen gelangen konnten, wurden diese permeabilisiert. Dazu wurden die Slides bei RT in 0,1% HCl getaucht, mit H₂O_{dd} gespült und für 10 min in 1x PBS mit 0,5% SDS inkubiert. Im Anschluss wurden die Slides mit H₂O_{dd} gewaschen und bei 37°C getrocknet.

Hybridisierung der Sonden

Ab der Verwendung der Sonden wurde im Dunkeln gearbeitet, um die Fluoreszenzfarbstoffe nicht auszubleichen. Die hier verwendeten Sonden mit gekoppelten Farbstoffen sind in Tabelle 2.6 (Kapitel 2.1.6) dargestellt. Die Working Solution (Tab. 2.19) wurde mit den Sonden (50 µg/ml) in Hybridisierungspuffer auf ein Endvolumen von 1,5 ml hergestellt und je 15 µl in die Wells aufgebracht. Im Vorfeld wurde eine feuchte Kammer (Tab. 2.19) durch ein KimTech-Tuch (Kimberly Clark Präzisionstücher, KIMTECH SCIENCE (KC 7552)) befeuchtet mit einer Formamid-Konzentration passend zur Sonde hergestellt. Zur Hybridisierung wurden die Slides im Dunkeln bei 46°C für 2-3 h in der feuchten Kammer inkubiert.

Der Hybridisierungspuffer und die Working Solution wurden angepasst an die Sonden hergestellt. Je nach Sonde wird eine andere Formamid-Konzentration benötigt. Die hier verwendeten Sonden wurden mit 20% FA vorbereitet.

Tabelle 2.19: Zusammensetzung des Hybridisierungspuffer, Working Solution und der feuchten Kammer.

Hybridisierungspuffer		Working Solution		Feuchte Kammer	
	Volumen in ml (20% FA)		Volumen in ml		Volumen in ml (20% FA)
5 M NaCl	1,08	Je Sonde Hybridisierungspuffer	0,1 auf 1,5 auffüllen	H ₂ O _{dd}	1,6
1 M tris-HCl (pH 8)	0,12			Formamid	0,4
H ₂ O _{dd}	3,6				
20% SDS*	0,003				
Formamid	1,2				

*SDS wurde im auf 60°C erwärmten Puffer gelöst und im Anschluss nach dem Erkalten Formamid hinzu gegeben.

Der Hybridisierungspuffer wurde vor Gebrauch steril filtriert (0,2 µm) und konnte danach aliquotiert bei -20°C gelagert werden.

Waschen

Nach der Hybridisierung wurden die Slides im Dunkeln gewaschen. Dazu wurde der Waschpuffer (Tab. 2.20) zunächst auf 48°C erwärmt und die Slides einmal für eine Minute und einmal für 15 min ebenfalls bei 48°C in diesem inkubiert. Nach einem kurzen Waschschrift in H₂O_{dd} wurden die Slides für 10 min bei RT in 1x SSC (Tab. 2.20; 1:20 verdünnt mit H₂O_{dd}) inkubiert und wiederum mit H₂O_{dd} gewaschen.

Der Waschpuffer wurde, angepasst an die zuvor verwendete FA-Konzentration, hergestellt und verwendet.

Tabelle 2.20: Zusammensetzung des Waschpuffers und 20x SSC.

Waschpuffer		20x SSC [pH 6]	
	Volumen in ml (20% FA)		
5 M NaCl	2,15	NaCl	175,3
1 M tris-HCl (pH 8)	1	C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ * 2 H ₂ O	88,2
0,5 M EDTA (pH 8)	0,5	H ₂ O _{dd}	auf 1 L aufgefüllt
20% SDS	0,025		
H ₂ O _{dd}	auf 50 ml aufgefüllt		

DAPI-Färbung

Eine DAPI-Färbung wurde ergänzend zu den spezifischen Markierungen über Sonden verwendet. DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in die kleine Furche der DNA unspezifisch an AT-reiche Regionen bindet. Die DAPI-Lösung wurde mit 1 µg/ml DAPI (Stocklösung; 1 mg/ml) hergestellt. Pro Probe wurden 15 µl Färbelösung in ein Well gegeben und bei RT für 5 min inkubiert. Danach wurde der Slide zweimal mit H₂O_{dd} und einmal mit 100% EtOH gespült und getrocknet.

Zum Einbetten der Proben, um sie haltbar zu machen und um das Mikroskopieren vorzubereiten, wurde ein Einbettpuffer (Tab. 2.21) hergestellt und jeweils ein Tropfen auf die Proben gegeben. Darauf wurde ein Deckglas (24 x 60 cm², Roth, Karlsruhe) gelegt und mit dem Puffer getrocknet, damit die Proben mikroskopiert werden konnten. Bis dahin sind diese bei -20°C lagerbar.

Tabelle 2.21: Zusammensetzung des Einbettpuffers.

Einbettpuffer	
	Volumen in ml
Citiflour	2,15
Vectashield	1
1x PBS	0,5

2.2.9.9. Mikroskopie

Alle mikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem LEICA DM5500 B Mikroskop und einer LEICA CTR5500 Steuereinheit gemacht und mittels einer LEICA GFC360 FX Kamera aufgenommen.

2.2.9.10. Phasenkontrastmikroskopie

Die Auflösung von Zellen gegenüber ihrer Umgebung ist im Durchlicht oftmals nicht ausreichend, um diese abzubilden. Dies kann erst durch Verschiebung des Phasenkontrasts möglich gemacht werden. Mit dem Einsatz eines Phasenkontrastrings im Objektiv und einer Ringblende kann dieser Phasenkontrast durch eine Veränderung der Amplitude unterstützt

werden. Dadurch kann der Einfluss des gebeugten Lichtes, das mit dem direkten Mikroskoplicht interferiert, verstärken und das Objekt räumlicher dargestellten.

2.2.9.11. Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie beruht darauf, dass Fluoreszenzfarbstoffe, die über kurzwellige Strahlung angeregt werden können, bei ihrem Zurückfallen in den Grundzustand langwellige Strahlung emittieren. Im Labor verwendete Fluoreszenzmoleküle setzen Wellenlängen im sichtbaren Bereich frei, die mithilfe eines wellenlängenselektiven Filters (*band-pass*, BP) zur Untersuchung von fluoreszenzmarkierten Präparaten isoliert betrachtet werden können.

Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden hier Cy3, FITC und DAPI verwendet. Das an die Bakterien - Sonde gehängte Cy3 wurde über Licht im Wellenlängenbereich von grünem Licht angeregt und emittierte rotes. Die Archaea - Sonde wurde mit FITC markiert, welches, durch Anregung mit blauem Licht, grünes emittiert. DAPI hingegen markiert durch Interkalieren in die Struktur der Nukleotid-Stränge unspezifisch DNA. Es wurde durch UV - Licht angeregt, wodurch kurzwelliges, blaues Licht sichtbar wurde. Diese drei Farbstoffe (Tabelle 2.22) sind aufgrund ihres unterschiedlichen Spektrums gut miteinander kombinierbar.

Tabelle 2.22: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe und die dafür eingesetzten Filter.

Farbstoff (Anregung - Emission)	Filter (Anregung – dichromatischer Filter - Emission)
DAPI (358 – 461 nm)	A4 (BP 360 - 400 - BP 470 nm)
Cy3 (550 – 568 nm)	Y3 (BP 545 - 565 - BP 610 nm)
FITC (495 – 520 nm)	L5 (BP 480 - 505 - BP 527 nm)

2.2.10. Analytische Methoden

Während der Erstellung dieser Arbeit wurden verschiedene analytische Methoden angewandt. Alle Schritte (Fermentation, BES, Ankonzentrierung und Feststoffentfernung durch Membranfiltration, Wachstumsversuche und Produktion einer Plattformchemikalie) wurden über regelmäßige Probenahmen und deren Analysen überprüft. Neben HPLC, pH-Wert und TOC-Messung wurde die Gasphase über eine Mikro-GC und zusätzlich Proben zur Acetoin-Bestimmung über einen Enzymtest und eine GC analysiert.

2.2.10.1. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Um organische Säuren und qualitativ Acetoin zu bestimmen, wurde eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (hier: UltiMate3000; Thermo Scientific) durchgeführt.

Generell beruht die Funktionsweise eines chromatographischen Trennverfahrens auf einer stationären und einer mobilen Phase, deren Bestandteile je nach funktionellen Gruppen und Molekülgrößen unterschiedlich stark an der stationären Phase binden. Je nach Bindung werden diese jeweils zu charakteristischen Zeitpunkten (Retentionszeit) wieder von der Säule eluiert. Über entsprechende Detektoren, wie UV/VIS-Lampen, können die gelösten Komponenten durch ein Chromatogramm sichtbar gemacht, charakterisiert und mithilfe von Eichgeraden die Stoffmengen errechnet werden.

Die untersuchten Proben wurden über eine Säule (hier: Aminex HPX-87H; 300 x 7,8 mm, BioRad, München) gepumpt, die beinhaltete stationäre Phase war zur Auftrennung von organischen Säuren ausgelegt. Als Laufmittel wurden 5 mM H₂SO₄ bei einer Flussrate von 0,6 ml/min und einer Ofentemperatur von 60°C verwendet. Zur Vorbereitung wurden die Proben 0,2 µm filtriert und 150 µl Probe mit 15 µl 0,5 M H₂SO₄ versetzt. 50 µl der angesäuerten Proben wurden über die Probenautomatik bei 190 - 220 nm analysiert. Ein Lauf dauerte 45 bis 50 min, wobei mindestens nach jeder dritten Proben ein 30-minütiger Waschschrift mit 50 mM H₂SO₄ durchgeführt wurde.

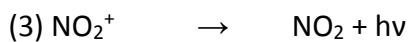
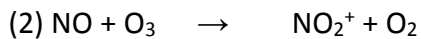
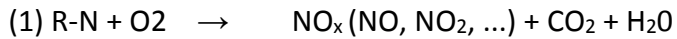
2.2.10.2. Totaler organischer Kohlenstoff (TOC)

Der gesamte Kohlenstoffgehalt einer Probe wurde mittels des TOC-Analysators multiWin N/C 2100S und dem TOC-Gasgenerator TG 600 (Analytik Jena) gemessen. Dazu wurden zur Vergleichbarkeit zu den über HPLC analysierten Proben ebenfalls flüssige, filtrierte (Ø 0,2 µm) Proben verwendet. Da die Differenzierungsmethode via automatischem Probennehmer verwendet wurde, wurden der Gesamtgehalt an Kohlenstoff (TC) und der inorganische Kohlenstoffgehalt (TIC) gemessen und daraus der organische Kohlenstoffgehalt (TOC) errechnet: $TC - TIC = TOC$.

Die Messung des TIC erfolgte über die Einspritzung der Probe in den TIC-Port, wo diese durch 10%-ige H₃PO₄ angesäuert und der ausgetriebene CO₂ zum Focus Radiation NDIR-Detektor® geleitet wurde. Der TC wurde thermisch mit Sauerstoff und Platin als Katalysator bei 800°C zu

CO₂ umgesetzt und ebenfalls über den NDIR-Detektor erfasst. Über hinterlegte Eichgeraden mit bekannter Konzentration konnte der Kohlenstoffgehalt zurückgerechnet werden.

Neben der Kohlenstoff - Bestimmung konnte gleichzeitig der gesamte Stickstoffgehalt einer Probe mit einem integrierten Verfahren gemessen werden. Eine weit verbreitete und hier angewendete Technik ist die Detektion mittels Chemolumineszenz - Detektor (CLD). Durch eine Hochtemperaturverbrennung in einer Sauerstoffatmosphäre wurden Stickstoffverbindungen wie folgt in NO_x (NO und NO₂) umgewandelt:



Zur Detektion wurde das Messgas mit den Stickstoffverbindungen durch einen Konverter geleitet, der NO₂ zu NO reduziert, dieses wurde in Sauerstoff- und im Anschluss unter Ozon - Atmosphäre oxidiert. Das O₃ (Ozon) wurde innerhalb der Anlage aus Sauerstoff (O₂) erzeugt. Während der Oxidation mit O₃ wurde kurzzeitig (Formel (2)) NO₂⁺ in angeregtem Zustand gebildet. Beim Zurückfallen in seinen Ursprungszustand emittierten die Moleküle Strahlung im Bereich von sichtbarem Licht, welches proportional zur NO₂⁺ - Konzentration war. Da nur NO auf diese Weise detektiert werden konnte, ist das Nachweis - Verfahren sehr selektiv. Die zu untersuchenden Proben wurden je nach erwartetem Kohlenstoffgehalt verdünnt. Flüssigproben wurden meist als 1:20-Verdünnung mit H₂O_{dd} gemessen. Das Programm wurde so gewählt, dass von jeder Probe mindestens dreimal der TC und der TIC gemessen wurden. Dafür wurden über eine 250 µl-Spritze automatisch jeweils 200 µl entnommen. Bei Schwankungen analysierte das Gerät selbsttätig eine vierte Messung. Gleichzeitig wurde für alle Proben der Gesamtstickstoffgehalt gemessen. Flüssigproben wurden in zwei Milliliter Röhrchen ohne Röhren geladen und gemessen.

2.2.10.3. Gaschromatographie

Zusätzlich zur HPLC-Messung wurde ein Gaschromatograph verwendet, um organische Komponenten, die ähnliche oder gleiche Retentionszeiten auf dem HPLC zeigten, detektieren und quantifizieren zu können. Wie schon beschrieben, wurden auch hier die zu untersuchenden Proben durch eine Probenautomatik in das System eingespritzt und die enthaltenen Substanzen interagierten mit einer Säule, wobei die Interaktionsart und -stärke

Einfluss auf die Retentionszeit hat. Verwendete wurde der GC-2010 Plus (Shimadzu) mit einer Stabiwax-DA Säule (30 m; \varnothing 0,25 μ m). Für die Laufzeit von 30 min je Probe wurde eine Säulentemperatur von 150°C genutzt und danach zum Ausheizen aller organischen Komponenten für 8 min 240°C. Als Laufmittel diente Helium. Jede zehnte Proben wurde ein Spülschritt mit 17% Methanol durchgeführt. Es wurden 450 μ l Probe mit 50 μ l 17%-er Phosphorsäure versetzt gemessen, wobei nur 1 μ l Probe über eine Spritze mit 5 μ l entnommen und gemessen wurde. Wie in anderen Chromatographie-Systemen wurde die Konzentration und Charakterisierung der zu untersuchenden Komponenten über die entsprechenden Eichgeraden vorgenommen.

2.2.10.4. Mikro-Gaschromatographie

Zur Analyse der Gaszusammensetzung wurde der Gaschromatograph 490 Micro GC der Firma Agilent (Waldbronn, Deutschland) verwendet. Die Gasphase des letzten Fermentationslaufs wurde direkt durch Ansaugen der Probe für 30 Sekunden über einen gasdichten Port und einer Kanüle aus den Flaschen analysiert. Die Proben wurden über zwei Säulen aufgetrennt, wobei der Probenlauf 5 min betrug. Für beide Säuren wurde als Trägergas Argon und eine Injektionstemperatur von 110°C verwendet. Die Säule PPQ 10 m wurde mit einer Säulentemperatur von 45 °C gefahren, wobei die Rückflusszeit auf 5 Sekunden gesetzt wurde. Dagegen wurde die MS5A (10m) mit einer Säulentemperatur von 70 °C und einer Rückflusszeit von 6 Sekunden gefahren.

Zur Kalibration des Gaschromatographen wurden Anaerobflaschen mit Gummistopfen dreimal mit dem jeweiligen Gas oder Gasgemisch gespült, indem abwechselnd begast und Vakuum gezogen wurde. Je nach Gas wurde, da keine Möglichkeit zur genauen Gasabmessung bestand, eine Ein-, Zwei oder Drei-Punkt-Kalibrierung durchgeführt.

Die Gasphasenmessung des Fermentationsversuchs wurde jeweils einmal in der Woche durchgeführt. Die Flaschen mit H₂/CO₂-Gemisch wurden vor der Messung aufgefüllt, da teilweise ein Unterdruck entstanden war und die Ansätze ansonsten Luft gezogen hätten. Die entstandenen Gase wurden verrechnet. Nach der Messung wurde die Gasphase, durch mehrmaliges Vakuumziehen und anschließender Begasung von mindestens einer Minute mit dem gewünschten Gas, wieder eingestellt.

2.2.10.5. Nachweis von Acetoin (Voges-Proskauer-Reaktion)

Zum Nachweis von Acetoin wurde, neben der Detektion über die GC, die Voges-Proskauer-Reaktion verwendet. Dabei wird Acetoin photometrisch bei 490 nm in einer 96-Well-Platte (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) quantitativ untersucht. Für jede Platte wurde ein Reaktionsansatz aus 10 ml H₂O, 1,4 ml 10 mg/ml L-Arginin, 1,2 ml Barritt Reagenz A (α -Naphthol in EtOH) und 1 ml Barritt Reagenz B (40% KOH) hergestellt. Von jeder Probe wurden 20 μ l für den Assay vorgelegt und 140 μ l Reaktionsmix zugegeben. Jeweils zwei Standardreihen (0 -5 μ M Acetoin) wurden je Platte verwendet, und wie die Proben, pipettiert. Die Platten wurde im Anschluss bis zur Messung für mindestens 30 min bei RT oder 37°C inkubiert.

2.2.11. Sequenzierung und Bioinformatische Analyse

2.2.11.1. Sequenzierung

Zur Überprüfung korrekter DNA-Sequenzen nach der Generierung, dem Einbringen eines Plasmids in einen bakteriellen Stamm oder der Charakterisierung einer Kultur wurde eine Sequenzierung durchgeführt. Dazu wurden Amplifikate oder aufgereinigte Plasmide mit den passenden Primern von der Firma GATC Biotech (Konstanz) oder mwg eurofins (Ebersberg) sequenziert und die enthaltenen Sequenzen über ein Referenzgenom mit der CLC Genomics Workbench (Quiagen; Venlo, Niederlande) oder über eine BLAST-Suche mit hinterlegten Stämmen verglichen.

2.2.11.2. Illumina®-Sequenzierung

Bei der Illumina®-Sequenzierung handelt es sich um eine *next-generation* Sequenzierungsmethode. Die über PCR hergestellten zu untersuchenden Fragmente werden mit Adaptern versehen und erneut vervielfältigt. Da die Adapter an beide Stränge angebracht werden, ist eine *paired-end* Sequenzierung möglich. Durch Ablesen beider Stränge wurde die Sequenzqualität erhöht. Die aufgespalteten Einzelstränge wurden auf beschichtete Oberflächen aufgebracht, auf die komplementäre Sequenzen zu den angebrachten Adaptern fixiert waren. Daran konnten die DNA-Stränge gebunden über Brückenamplifikation vervielfältigt werden. Im Anschluss wurden zunächst alle *forward*-Stränge sequenziert. Eine Polymerase vervollständigte dafür die Einzel- zu Doppelsträngen, wobei fluoreszenzmarkierte

Nukleotide eingebaut wurden. Diese gaben beim Einbau ein charakteristisches Lichtsignal ab, das detektiert wurde. Nach dem gleichen Prinzip wurden auch die *reverse*-Stränge sequenziert, wodurch viele Stränge gleichzeitig abgelesen wurden. Die ausgelesenen Signale wurden zu einem Sequenzierungsergebnis zusammengefasst.

Zur Analyse der mikrobiellen Zusammensetzung der Fermentation wurde diese über eine Illumina®-Sequenzierung analysiert. Die über eine phusion-PCR (Kapitel 2.2.5.4) vorbereiteten Amplifivate (Primer für Bakterien und Archaeae) wurden zuerst in einer PCR getestet, um die Primerbindung zu überprüfen und im Anschluss von der Firma IMG (Martinsried, Deutschland) über eine IlluminaSeq® sequenziert (Primer: Tab. 2.5). Hierbei wurden *paired-end* Sequenzen mit 2x 250 bp generiert (MiSeq Next Generation Sequencing, Illumina Inc., San Diego, USA).

Bioinformatische Auswertung

2.2.11.3. BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

Um Kolonien oder Kulturen phylogenetisch einordnen zu können, wurden diese nach der Amplifikation über PCR und Aufreinigung sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden gegen Sequenzen einer Datenbank verglichen. In dieser Arbeit wurde die Datenbank des National Center for Biotechnology Information (ncbi; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) verwendet. Die Übereinstimmung der zu untersuchenden Sequenzen wurden mit hinterlegten verglichen und deren Qualität angegeben. Dies wurde vor allem zur Überprüfung der Reinheit laufender Kulturen oder des Genoms bzw. der Sequenz eines Plasmids, wie für Deletionsmutanten, eingesetzt.

2.2.11.4. Metagenomdaten

Die Daten der Illumina®-Sequenzierung wurden von IMG als FastQ-Dateien geliefert, die bioinformatisch mit dem Programm CLC Genomics Workbench (Version 10.1.1, Quiagen; Venlo, Niederlande) und dem Microbial Genomics Module (Quiagen; Venlo, Niederlande) analysiert wurden. Zunächst wurden die Primersequenzen von den zu untersuchenden 16S-Sequenzen entfernt und danach ein Quality-Trimming durchgeführt. Dabei wurden unbestimmte Sequenzabschnitte (NN) und solche von geringer Qualität ($p = 0,05$) abgetrennt. Im Anschluss wurden die *forward* und *reverse* Stränge zusammengesetzt und alle Sequenzen zur

Vergleichbarkeit auf die gleiche Länge gekürzt. Beim sogenannten OTU-Clustering (Operational Taxonomic Unit) wurden Sequenzen mit >97% Übereinstimmung zu einem Cluster zusammengefasst. Alle Sequenzen einer Art clusterten dadurch zusammen. Als Referenzdatenbank wurde die SILVA-Datenbank gewählt. Zusätzlich konnte die Diversität in einer Probe oder der Proben zueinander über Abstandsmatrices (α oder β -Diversität) angegeben werden-

3. Ergebnisse

Unterteilt sind die Schritte dieser Arbeit in Fermentation, Abreinigung und Stromproduktion in einer bioelektrochemischen Zelle sowie Produktion der Plattformchemikalie Acetoin aus Propionat. Daneben wurden zwei Membranen getestet, um organische Säuren in wässriger Lösung aufzukonzentrieren.

3.1. Fermentation

Alle Fermentationsansätze wurden mit einer cellulosehaltigen Biomasse und einem Abwassermix gestartet. Dazu wurde zunächst der Einfluss des pH-Werts auf den Prozess in einem Volumen von 250 ml unter Stickstoffatmosphäre untersucht. Im Folgenden wurde das Kulturvolumen zunächst auf einen Liter und im Anschluss auf zwei Liter vergrößert. Das eingesetzte Konsortium wurde jeweils für die neuen Versuche überführt und daher im Laufe der Versuche an die Biomasse und die Bedingungen adaptiert. Zusätzlich wurde der Einfluss der Gasphase auf das Produktspektrum getestet. Während dieses Versuchs wurde zudem die Produktion der kohlenstoffhaltigen Gase Methan und Kohlenstoffdioxid untersucht. Alle Fermentationen wurden bei 30°C durchgeführt und bei 180 rpm schüttelnd inkubiert. Je nach Bedarf wurden die Gasphase und der pH-Wert eingestellt bzw. erneuert.

Am Ende des ersten Aufbaus, der Untersuchung des Einflusses des pH-Werts, und dem Gasphasen-Aufbau wurden jeweils die mikrobielle Zusammensetzung via Illumina®-Sequenzierung analysiert.

3.1.1. 250 ml Fermentation von Toilettenpapier und Holzpellets

Um das Abwasserinokulum hinsichtlich der Produktivität zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Biomassen getestet. Da in einem vorangegangenen Versuch beobachtet wurde, dass bei der Fermentation von Holzpellets kein Methan gebildet wird, wurde diese cellulosehaltige Biomasse hier ebenfalls eingesetzt. Daneben wurde als Abfallbiomasse Toilettenpapier verwendet. Die Gasphase wurde mit 99%-iger Stickstoff anaerobisiert und der Einfluss der pH-Werte 5, 6 und 7 getestet.

In Abb. 13 sind die Konzentrationen der organischen Säuren der Fermentationsansätze über den Versuchszeitraum bei den pH-Werten 5, 6 und 7 zu sehen. Über einen Zeitraum von

insgesamt 80 Tagen wurde regelmäßig der pH-Wert durch Probennahme überprüft und gegebenenfalls eingestellt. Zudem wurde im Abstand von drei Tage eine Probe zur Analyse via HPLC und TOC entnommen.

Beide Biomassen wurden (mechanisch zerkleinert) in vergleichbaren Partikelgrößen eingesetzt. Durch den Aufkochschritt während des Autoklaviervorgangs kann ebenfalls ein Aufschluss stattgefunden haben. Dieser wurde, da alle Ansätze autoklaviert eingesetzt wurden, nicht weiter untersucht.

Durch die Fermentation der Holzpellets bei pH 5 wurden bis zu 10 mM Acetat und Propionat produziert, jedoch konnte kein Butyrat detektiert werden. Bei den pH-Werten 6 und 7 sind bis zu 15 mM Acetat, 8 mM Propionat und 4 mM Butyrat entstanden. Bei allen pH-Werten fand nach 40 Tagen keine Zunahme der Konzentration der organischen Säuren mehr statt. Der Acetatgehalt der Pellet-Ansätze lag zu Beginn des Versuchs bereits bei 6 ± 2 mM.

Bei der Fermentation von Toilettenpapier zeigte der pH-Wert einen größeren Einfluss. Ein pH-Wert von 5 führte nicht zur Produktion von Butyrat. Die Konzentrationen von Acetat und Propionat lag bei maximal 10 mM und bei 4 mM. Im Gegensatz zu den Ansätzen mit Holzpellets wurden die organischen Säuren in den Ansätzen mit Papier nicht wieder abgebaut. Jedoch zeigte sich auch hier, dass durch die Fermentation bei pH 5 und pH 6 nach etwa 40 Tagen die höchsten Konzentrationen an VFA erreicht wurden. Durch die Fermentation bei pH 6 konnte mit $18,6 \pm 6,6$ mM die größte Konzentration an Butyrat produziert werden. Hier wurde zudem der geringste Acetatgehalt (max. $17,4 \pm 1,5$ mM) im Verhältnis zu den anderen zwei Säuren gemessen.

Bei pH 7 blieb die Konzentration an Butyrat ab Tag 35 unverändert bei etwa 10 mM. Der Acetatgehalt stieg bis zum Ende des Versuchs auf $45,7 \pm 31,3$ mM an. Propionat zeigte am Tag 63 den größten Wert von $36,4 \pm 6$ mM.

In allen Ansätzen stiegen gegen Ende der Laufzeit die Abweichungen innerhalb der Triplikate an.

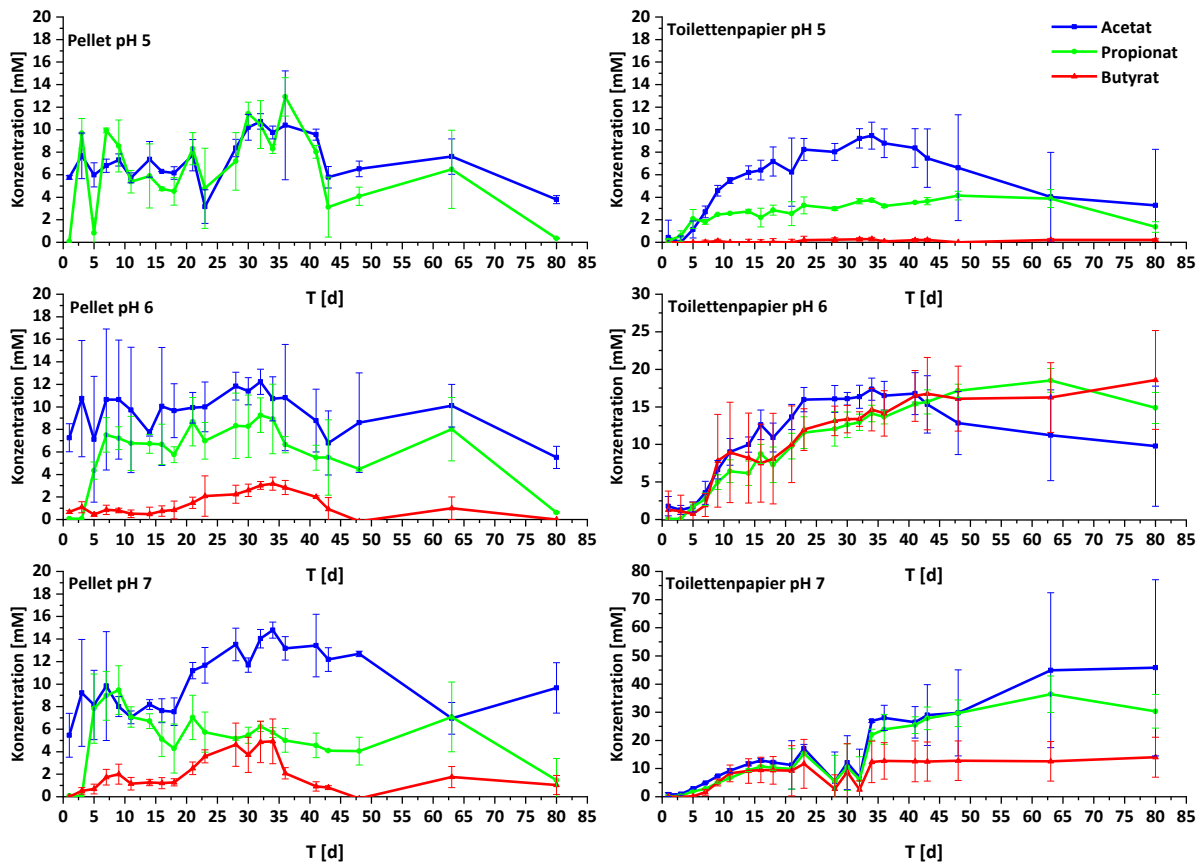


Abbildung 13: Konzentrationen organischer Säuren in Abhängigkeit der Fermentationsdauer bei verschiedenen pH-Werten. Die Biomassen Holzpellet und Toilettenpapier wurden bei den pH-Werten 5, 6 und 7 getestet. Die Fermentationsansätze links mit Holzpellets und rechts mit Toilettenpapier gezeigt. Die Biomassen wurden mit 2% w/v eingesetzt. Die Fermentation erfolgte mit N_2 -Gaspphase und $30^\circ C$. In blau ist Acetat, in grün Propionat und in rot Butyrat dargestellt.

Für die Versuche mit Papier wurde die Kohlenstoffbilanz der Flüssigphase erstellt. Dazu wurde der gesamte Kohlenstoffgehalt der Lösung (C_{TOC}) sowie die Konzentration der einzelnen organischen Säuren (C_{VFA}) bestimmt. Der Kohlenstoff, der gebunden in organischen Säuren gemessen wurde, wurde ins Verhältnis zum gesamten gelösten Kohlenstoff gesetzt. Der gelöste gesamte Kohlenstoff wurde von gefilterten Proben bestimmt, sodass die unlöslichen Cellulosefasern in der Messung nicht erfasst wurden.

In Abb. 14(A) ist gezeigt, dass mit steigendem pH-Wert auch der Kohlenstoffgehalt der Flüssigphase steigt. Für jede Probe wurde der Gesamtkohlenstoff der Flüssigphase als TOC gemessen und der Kohlenstoffgehalt der organischen Säuren ermittelt. Daraus wurde das Verhältnis und damit die Wiederfindung des Kohlenstoffs in den löslichen Produkten bestimmt. Dadurch kann der Gehalt sowohl an löslichen als auch an flüchtigen gasförmigen Kohlenstoffverbindungen, wie Methan oder CO_2 , ermittelt werden.

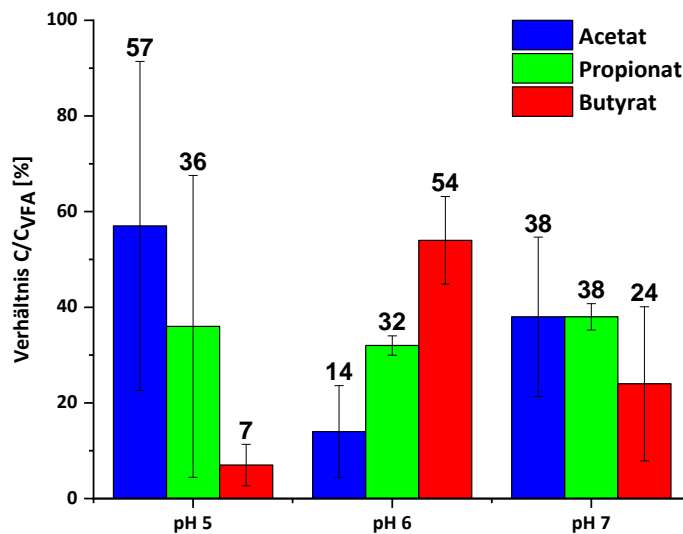
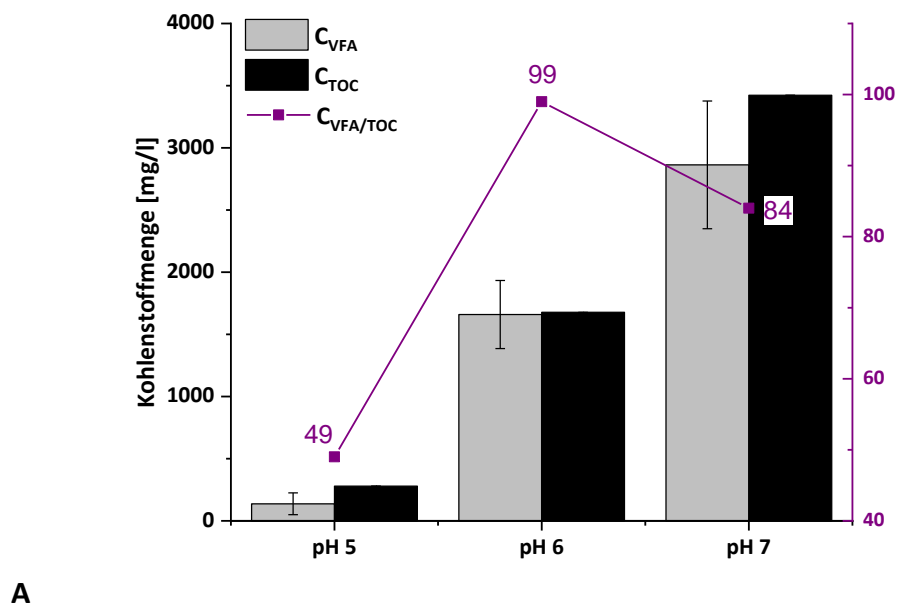


Abbildung 14: Kohlenstoffgehalt der Flüssigphase nach der Fermentation mit Toilettenpapier nach 80 Tagen. (A) Verteilung des Kohlenstoffgehalts der organischen Säuren (C_{VFA}) im Verhältnis zum gesamt löslichen Kohlenstoffanteil (C_{TOC}). In violett ist der Anteil der organischen Säuren am gelösten Kohlenstoff angegeben. (B) Verhältnis des Kohlenstoffgehalts der einzelnen Säuren gegeneinander bei pH 5, 6 und 7. Der Gesamtkohlenstoffgehalt in den organischen Säuren wurde auf 100% gesetzt.

Bei pH 5 zeigte sich ein Gehalt von 137 ± 88 mg/l Kohlenstoff gebunden in organischen Säuren. Dagegen konnte ein löslicher Gesamtkohlenstoffgehalt von $279 \pm 0,1$ mg/l gemessen werden. Dadurch ergibt sich eine mittlere Wiederfindung des gelösten Kohlenstoffs in organischen

Säuren von 49%. Durch die Fermentation bei pH 6 wurden 1659 ± 274 mg/l Kohlenstoff als organische Säuren produziert, wohingegen in der Flüssigphase $1677 \pm 0,6$ mg/l Kohlenstoff gemessen wurden. Daher liegt hier die Wiederfindung gemittelt bei 99%. Bei einem pH-Wert von 7 zeigte sich der größte Kohlenstoffgehalt, sowohl in den drei gefundenen organischen Säuren (2863 ± 513 mg/l) als auch im gelösten Kohlenstoff ($3423 \pm 0,8$ mg/l). Die Wiederfindung des löslichen Kohlenstoffs in organischen Säuren lag damit bei 84%.

Die Aufstellung der Verhältnisse des in den organischen Säuren (VFA) gebundenen Kohlenstoffs ist in Abb. 14(B) gezeigt. Hier wird ersichtlich, dass bei pH 5 der meiste Kohlenstoff absteigend in Acetat, gefolgt von Propionat und dann in Butyrat gebunden ist. Jedoch zeigte sich ein großer Standardfehler (Acetat $57 \pm 34\%$, Propionat $36 \pm 32\%$, Butyrat $4 \pm 4\%$).

Bei pH 6 zeigte sich das umgekehrte Bild. Dabei wurde der meiste Kohlenstoff mit $54 \pm 9\%$ in Butyrat gebunden. In Propionat wurden $32 \pm 2\%$ und in Acetat $14 \pm 10\%$ des Kohlenstoffgehalts der organischen Säuren gefunden. Durch die Fermentation bei pH 7 zeigte sich mit $38 \pm 17\%$ und $38 \pm 3\%$ der gleiche Kohlenstoffgehalt gebunden in Acetat und Propionat. In Butyrat waren hingegen $24 \pm 16\%$ des Kohlenstoffs gebunden.

Bei jeder Probennahme wurde ein nicht messbarer Teil der Biomasse entnommen. Daher konnte am Ende des Versuchs keine exakte Kohlenstoffbilanz von Substrat zu Produkten aufgestellt werden. Für die Bilanz in Tabelle 3.1 wurde errechnet, wie viel Kohlenstoff in der Flüssigphase (TOC) und in den organischen Säuren theoretisch wiedergefunden werden konnte. Dazu wurde angenommen, dass das Substrat zu 100% aus Cellulose besteht. Daraus ergab sich eine Kohlenstoffmenge von $8,784$ g/l (bei 2% w/v). Die in den organischen Säuren nach 80 Tagen enthaltene Kohlenstoffmenge wurde dazu in Relation gesetzt (VFA – Substrat). Parallel wurde mit der Kohlenstoffkonzentration in der Flüssigphase (TOC – Substrat) verfahren. Dadurch konnte gezeigt werden, dass bei pH 5 3% des Kohlenstoffgehalts des Substrats in der Flüssigphase gefunden wurden und 2% davon in den organischen Säuren. Bei pH 6 konnten 99% des in der Flüssigphase gefundenen Kohlenstoffs auch in den organischen Säuren gefunden werden. Daher konnten hier 19% des im Substrat enthaltenen Kohlenstoffs in der Flüssigphase auch in den organischen Säuren gefunden werden. Wie schon in Abb. 14(A) gezeigt war der Kohlenstoffgehalt bei pH 7 in der Flüssigphase am größten. Hier konnten 39%

des Kohlenstoffs des Substrats in der TOC Fraktion gefunden werden. In den organischen Säuren lagen 33% des Kohlenstoffs in Relation zum Substrat gebunden vor.

Tabelle 3.1: Bilanz des Kohlenstoffgehalts im Substrat zum Kohlenstoffgehalt der Flüssigphase (TOC-Substrat) und zu den organischen Säuren (VFA-Substrat) nach 80 Tagen bei pH 5, pH 6 und pH 7. Die Gesamtausbeute bezieht sich auf die theoretisch maximal mögliche Ausbeute, wenn die gesamte Biomasse abgebaut wird.

Ansatz	C _{VFA} (mg/l)	C _{TOC} (mg/l)	Wiederfindung VFA in TOC	Gesamtausbeute (TOC- Substrat)	Gesamtausbeute (VFA-Substrat)
pH 5	137,3	279	49%	3%	2%
pH 6	1661,7	1677,1	99%	19%	19%
pH 7	2863,3	3423,3	84%	39%	33%

Der in abfiltrierbaren Stoffen gebundene Kohlenstoffgehalt wurde nicht gemessen. Über die eingesetzten Messmethoden war der technische Fehler bei der Partikelmessung in einer Probe bereits zu groß (>20%). Die Biomassenbildung durch mikrobielles Wachstum wurde nicht überprüft. Daher können hier keine Aussagen zur anabolischen Bindung von zellulärem Kohlenstoff getroffen werden.

Zudem war in allen Ansätzen am Ende der Versuche noch Biomasse vorhanden. Die Berechnung stellt daher die maximal mögliche Ausbeute an TOC und VFA dar, wenn die gesamte Biomasse abgebaut wurde.

3.1.2. Fermentationsansatz 1 L Papierhandtücher

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Fermentationsansätze bei pH 6 und 7 in einem vergrößerten Volumen von 1 L kultiviert. Die Kultivierungsbedingungen, wie das Salzmedium, Temperatur und Inokulum wurden beibehalten. Als Biomasse wurden hier Papierhandtücher verwendet. Diese wurden gewählt, da Papierhandtücher als reine Abfallbiomasse ohne Fremdmassen dem Abfallkreislauf entnommen werden können. Im Gegensatz zu Toilettenpapier sind Papierhandtücher Trockenabfallprodukte, z.B. am Waschbecken öffentlicher Toiletten. Dazu wurde 1:10 aus den laufenden Kulturen überführt und die Versuche mit frischem Medium und zerkleinertem Papier angesetzt. In diesen Ansätzen sollte untersucht werden, ob das Produktionsspektrum in größeren Volumina und über die Zeit stabil bleibt.

Wie in Abb. 15 dargestellt, werden abhängig vom eingestellten pH-Wert verschiedene Produktspektren erhalten. Im Gegensatz zu den Ansätzen mit 250 ml verändert sich die

Konzentration organischer Säuren bis zum Ende des Versuchs nach 83 Tagen. Bei pH 6 kann nach 55 Tagen ein maximaler Acetatgehalt von $10,6 \pm 5$ mM beobachtet werden, der bis zum Ende des Laufs (83 Tage) auf $6,3 \pm 7,6$ mM sinkt. Die Konzentration an Butyrat stieg bis Tag 18 und verbleibt im Anschluss bis zum Ende des Versuchs bei ca. $5,2 \pm 2,6$ mM. Den größten Anteil der organischen Säuren erreichte Propionat mit $19,5 \pm 5,4$ mM am Ende des Versuchs.

Durch eine Fermentation bei pH 7 wird im Vergleich weniger Butyrat ($2,1 \pm 0,4$ mM) produziert. Am Ende der Fermentation an Tag 83 liegen die Konzentrationen von Acetat und Propionat im Mittel fast auf dem gleichen Wert ($27,6 \pm 42,9$ mM bzw. $28,3 \pm 8,5$ mM). Der Fehlerwert der Triplikate für Acetat steigt ab Tag 36 ($21,3 \pm 6,2$ mM), sodass ab diesem Tag der Mittelwert der Ansätze etwa dem Fehlerwert gleicht.

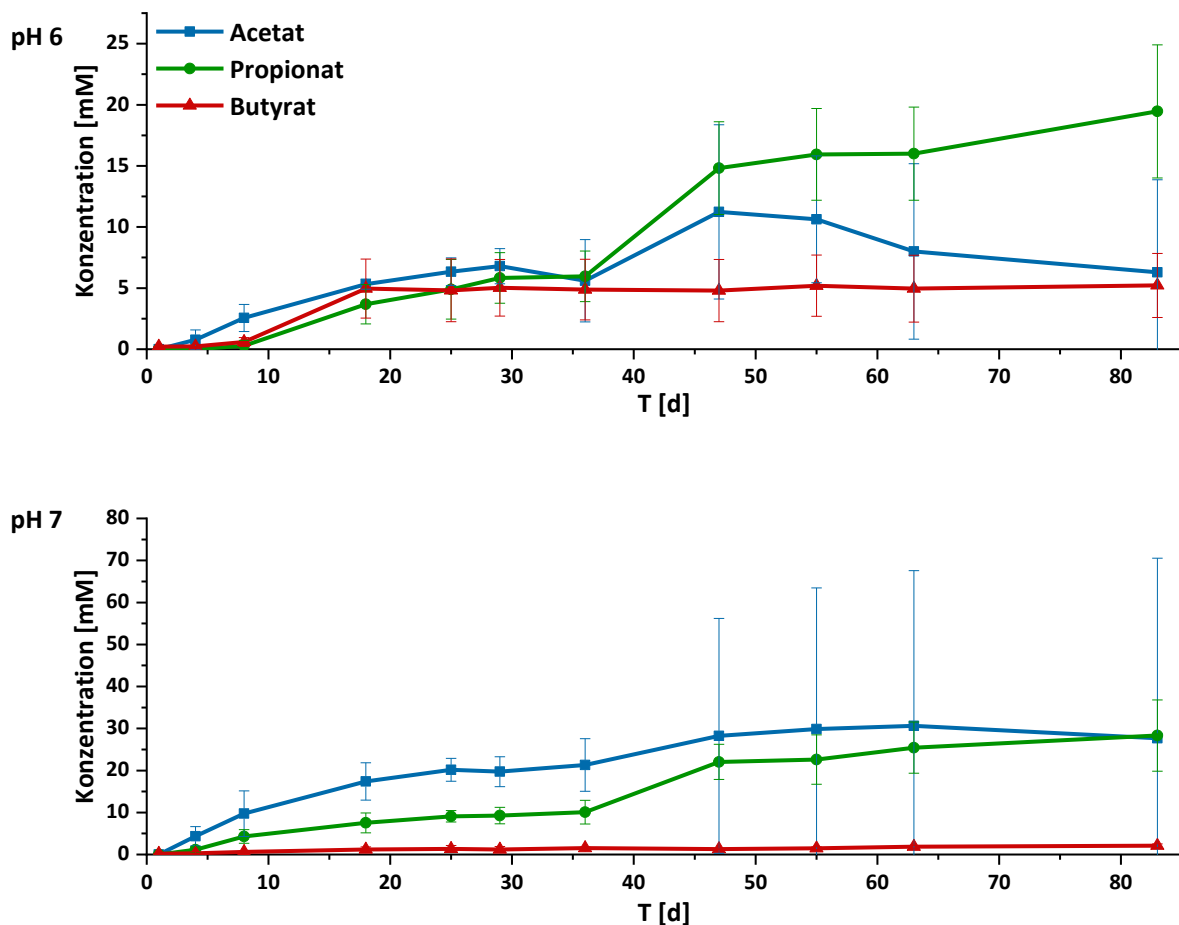


Abbildung 15: Konzentrationen der organischen Säuren während der Fermentation mit Papierhandtüchern als Abfallbiomasse in einem Volumen von 1 Liter bei pH 6 und 7. Die Fermentation erfolgte mit 2% w/v Biomasse bei 30°C.

Nachweis von Schwefelwasserstoff

Zusätzlich wurde ein Nachweis auf Schwefelwasserstoff mit Bleiacetatpapier durchgeführt. Bei Anwesenheit von Schwefelverbindungen entsteht Bleisulfid, welches das Papier dunkel färbt. Bei allen Proben konnte so in der Gasphase Schwefelwasserstoff nachgewiesen werden. Über eine Mikro-GC Messung konnte das nicht bestätigt werden.

Analytik der Salze des Fermentats

Nach 30 Tagen wurde eine gemischte Probe einer Fermentation von pH 6 und von pH 7 zudem am Institut für Wasserchemie und Wassertechnologie hinsichtlich der beinhalteten Salze untersucht (siehe Anhang: Tabelle A1 und Tabelle A2). Die Zusammensetzung und der Rückhalt der im Fermentat beinhalteten Salze beeinflusst das Ergebnis einer Nanofiltration. Einerseits verändert sich die Leitfähigkeit und durch Wechselwirkungen kann auch das Verhalten der organischen Säuren während der Filtration beeinträchtigt werden. In einer Bachelorarbeit am Institut für Wasserchemie und Wassertechnologie wurde eine Voruntersuchung zum Rückhalt von organischen Säuren mit unterschiedlichen Nanofiltrationsmembranen durchgeführt (s. Kapitel 3.3 - Nanofiltration).

Die Leitfähigkeit des Fermentats wurde stark von der Länge der Fermentation durch die Zugabe von NaOH beeinflusst. Daher wurden Leitfähigkeiten von 1,4 – 5,9 mS/cm gemessen.

3.1.3. Fermentation in 2 L mit Papierhandtüchern

Im Anschluss wurde das Volumen verdoppelt und die Ansätze in 2 L untersucht. Da die Ausbeute bei pH 5 insgesamt gering ausfiel wurden auch die weiteren Fermentationsansätze bei pH 6 und pH 7 untersucht. Wiederum wurden die Versuche durch das zuvor verwendete Konsortium (1:10) inokuliert gestartet. Dadurch konnten in den Fermentationsansätzen bereits zu Beginn organische Säuren detektiert werden. Sowohl die Fermentation bei pH 6 als auch bei pH 7 zeigte über den Verlauf von 40 Tagen zunächst einen Abbau der Propionatkonzentration (Abb. 16). Im Anschluss wurden Propionat und Butyrat nur geringfügig produziert. Bei pH 6 wurden über 43 Tage $8,9 \pm 2,1$ mM Propionat und $6,1 \pm 1,9$ mM Butyrat detektiert. Die Konzentration an Acetat betrug $36,4 \pm 1,9$ mM. Durch die Fermentation bei pH 7 zeigte sich eine ähnliche Verteilung der organischen Säuren, jedoch in

höheren Konzentrationen. Hier wurden $22,2 \pm 1,4$ mM Propionat und $10,9 \pm 2,9$ mM Butyrat produziert. Bis zu Tag 43 konnten $79,8 \pm 10,4$ mM Acetat gemessen werden.

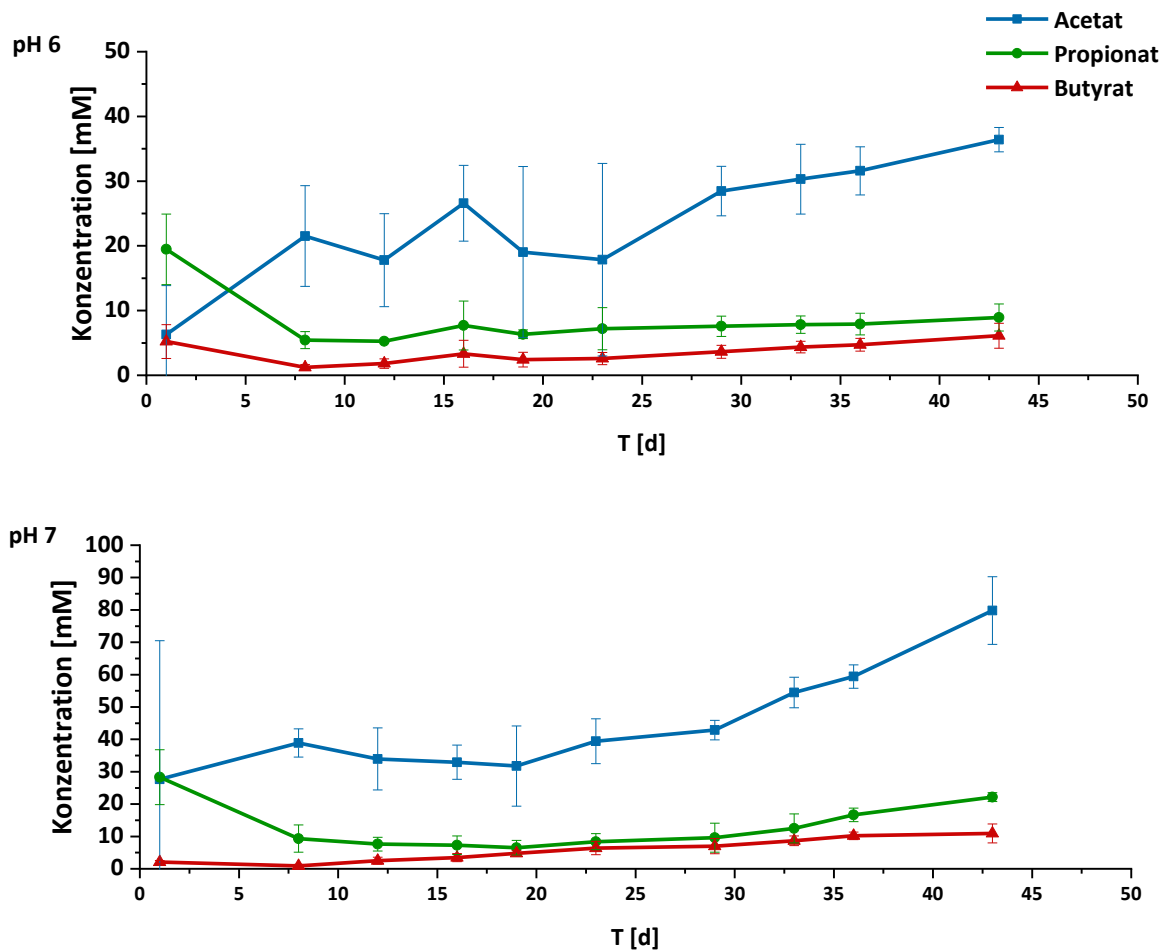


Abbildung 16: Verteilung organischer Säuren der Fermentation mit Handtuchpapier in 2 Litern. Diagramm oben: Die Verteilung der VFA bei pH 6. Diagramm unten: Verteilung der VFA bei pH 7. Die Fermentation erfolgte mit dem bereits etablierten Abwasserinokulum der vorherigen Fermentationsansätze bei 30°C, 2% w/v Biomasse und 180 rpm unter Stickstoffatmosphäre.

3.1.4. Einfluss der Gasphase

Neben dem Einfluss des pH-Werts auf das Produktspektrum der Fermentation sollte der Einfluss der Gasphase untersucht werden.

Im Rahmen einer Bachelorarbeit wurden die Fermentationsprodukte des Abwasserinokulums mit Glucose bei pH 5, 6, 7 und 8 mit den Gasphasen H₂/CO₂ (80%/20%) und N₂ (99%) untersucht. Glucose wurde verwendet, um den Aufspaltungsvorgang der Cellulose zu umgehen und schneller Fermentationsergebnisse mit einer messbaren Kohlenstoffquelle zu

erhalten. Dabei zeigte sich, dass bei pH 5 die Glucose über 30 Tage nicht vollständig verwendet wurde. Unter Stickstoffatmosphäre bei pH 6 entstanden Acetat, Butyrat und Propionat (pH 6: 50 mM, 40 mM und 25 mM) in ähnlicher Konzentration, wohingegen ab pH 7 Acetat dominierte (pH 7: Acetat 100 mM, Butyrat 25 mM, Propionat 20 mM). Bei pH 8 entstanden über 140 mM Acetat, wobei die Konzentrationen an Butyrat und Propionat unter 20 mM blieben. Unter Wasserstoffatmosphäre zeigte sich eine ähnliche Verteilung der Acetatkonzentration über die Zeit, jedoch wurde in allen Ansätzen deutlich mehr Butyrat, als Propionat (z.B. pH 6: 38 mM Butyrat, 20 mM Propionat) produziert.

In allen Ansätzen, unabhängig von der Gasphase oder dem pH-Wert, stieg parallel zu den produzierten organischen Säuren der Verbrauch der Glucose. Es wurde jedoch mehr Glucose verbraucht, als in den organischen Säuren wieder gefunden wurde. Da in diesem Versuch die Gaszusammensetzung nicht gemessen wurde, ist der Kohlenstoffgehalt der Gasphase nicht bekannt. Dabei stieg mit steigendem pH-Wert auch die Ausbeute der organischen Säuren aus Glucose. Von pH 5 bis 8 wurden 19%, 44%, 45% und 83% des Kohlenstoffgehalts wiedergefunden.

Diese Ergebnisse mit Glucose sollten mit Papierhandtüchern als Abfallbiomasse, wie in den zuvor beschriebenen Fermentationsansätzen, wiederholt werden. Da mit pH 5 kaum organische Säuren produziert wurden und die Kohlenstoffbilanz von pH 7 und pH 8 der Glucosefermentation ähnlich ausfiel, wurde in dem folgenden Versuch wieder bei pH 6 und pH 7 gearbeitet.

Dazu wurde, wie zuvor, von den laufenden Kulturen mit einer Mischprobe 1:10 inokuliert. Die Ansätze bei pH 6 oder pH 7 wurden entweder mit einer Wasserstoff/Kohlendioxid (80%/20%) oder einer reinen Stickstoffatmosphäre anaerobisiert. Für diesen Versuch wurden 100 ml Flüssigphase mit 2% w/v zerkleinerten Papierhandtüchern und einer 400 ml Gasphase verwendet.

Die Konzentration und Verteilung der hierbei produzierten organischen Säuren ist in Abb. 17 gezeigt. Über eine Laufzeit von 60 Tagen konnte in keinem der Ansätze mehr als 5 mM Propionat und Butyrat produziert werden. Das Produktspektrum hatte sich hierbei im Gegensatz zur ersten Fermentation verändert. Unabhängig vom pH-Wert und der Gasphase wurde in allen Versuchen hauptsächlich Acetat detektiert. Sowohl bei pH 7 als auch bei pH 6 wurde unter Stickstoffatmosphäre die größere Menge Acetat produziert. Die Endkonzentration bei pH 7 mit N₂ war $88,9 \pm 5,1$ mM und bei pH 6 mit N₂ $76,7 \pm 11,2$ mM

Acetat. Unter Wasserstoff/Kohlendioxid Atmosphäre wurde bei pH 6 $25 \pm 16,3$ mM und bei pH 7 $36,7 \pm 8,2$ mM Acetat produziert. Das meiste Propionat wurde bei pH 6 unter Stickstoffgasphase mit $4,8 \pm 0,4$ mM produziert. Unter H_2/CO_2 wurde ebenfalls bei pH 6 das meiste Butyrat mit $2,4 \pm 0,4$ mM gemessen.

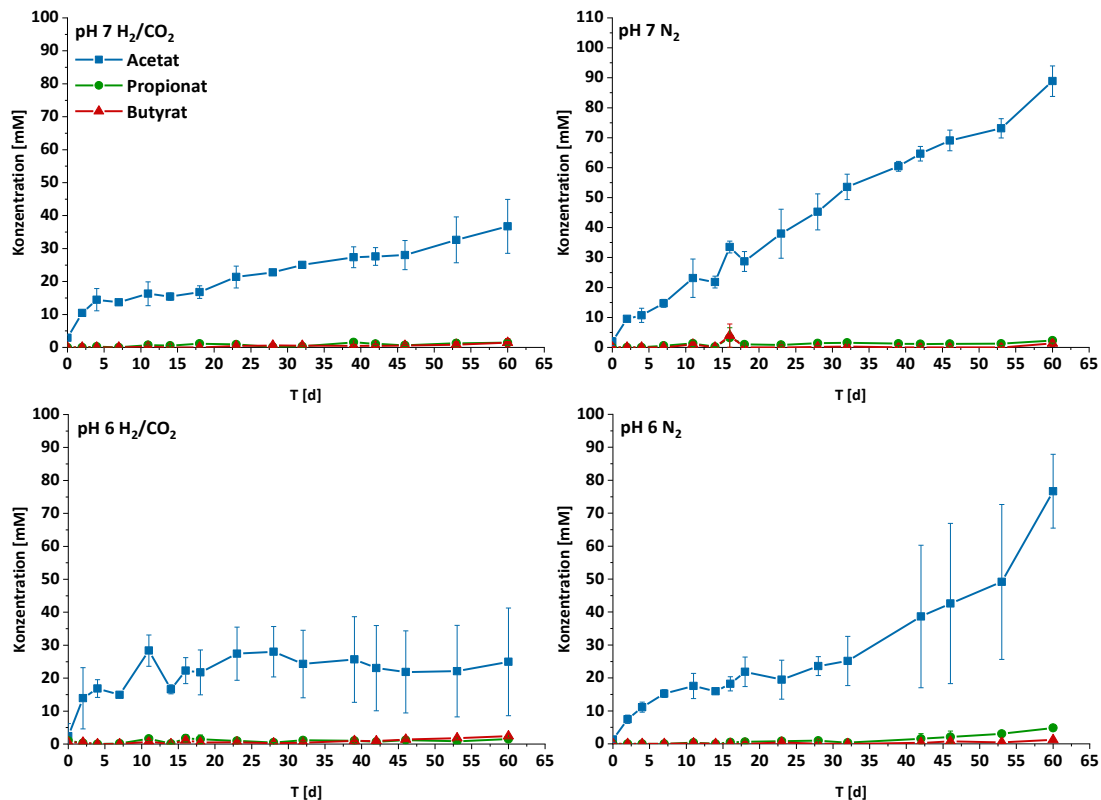


Abbildung 17: Der Einfluss der Gasphasen H_2/CO_2 (80%/20%) und N_2 (100%) auf die Produktion organischer Säuren durch die Fermentation von Papierhandtüchern. Die Konzentration von Acetat (blau), Propionat (grün) und Butyrat (rot) wurde bei pH 7 (oben) und pH 6 (unten) über 60 Tage aufgezeichnet. Die Fermentation erfolgte mit dem bereits etablierten Abwasserinokulum der vorherigen Fermentationsansätze bei $30^\circ C$, 2% w/v Biomasse und 180 rpm unter Stickstoffatmosphäre.

Neben der Überwachung der organischen Säuren wurde die Gasphase hinsichtlich H_2 -, CO_2 -, CH_4 -Verbrauch und -Produktion mittels Mikro-GC untersucht.

Dazu wurde nach jeder Gasmessung die Gasphase entweder mit H_2/CO_2 oder mit N_2 ausgetauscht und ein Überdruck von 0,5 bar eingestellt. Im Fall von H_2/CO_2 wurde die Gasphase nach einer Woche vor der Messung aufgefüllt, da durch den Gasverbrauch hier ein Unterdruck während der Fermentation entstand. Für die Messung via GC und um sicherzustellen, dass keine Luft hineingelangen konnte, wurde daher die Gasphase wieder auf

einen Überdruck von 0,5 bar eingestellt. Dieser Schritt war auch für die Massenerrechnung der Gase erforderlich.

Um den Kohlenstoffgehalt der Gasphase zu erhalten, wurde fortlaufend das entstandene oder verbrauchte CO₂ und CH₄ in deren Gehalt an Kohlenstoff umgerechnet. Der am jeweiligen Tag angegebene Gehalt ist die Summe der vorangegangenen Tage. Die Messergebnisse sind fortlaufend angegeben und daher aufsummiert in Abb. 18 zu sehen. Die Gasphase H₂/CO₂ ist dabei als „H“ und die Stickstoffgasphase als „N“ abgekürzt.

Die am Ende an Tag 53 produzierte Menge an Kohlenstoff in der Gasphase ist die Summe aus CH₄ und CO₂. Da bei der Begasung mit H₂/CO₂ bereits eine Menge an Kohlenstoffdioxid in die Gasphase eingebracht wurde, wurde diese Menge von dem gemessenen Wert abgezogen. Für diese Versuche zeigte sich bei pH 7 (H₂/CO₂) -207,74 ± 96,95 mg C in CO₂ und 906,75 ± 192,76 mg C in CH₄. Bei pH 6 wurden unter Wasserstoff-Kohlendioxid-Gasphase -128,86 ± 191,92 mg C in CO₂ und 237,51 ± 67,19 mg C in CH₄ gemessen. Unter beiden pH-Werten wurde demnach CO₂ verbraucht und Methan gebildet.

Unter Stickstoffatmosphäre wurde bei pH 7 59,31 ± 4,29 mg C in CO₂ und 71,98 ± 13,14 mg C in CH₄, bei pH 6 48,06 ± 12,06 mg C in CO₂ und 27,47 ± 19,07 mg C in CH₄ detektiert. Damit wurde unter Stickstoffatmosphäre bei beiden pH-Werten weniger Methan gebildet als in den Ansätzen unter Wasserstoffatmosphäre. Jedoch wurde auch Kohlenstoffdioxid unter Stickstoffatmosphäre produziert.

Am Ende des Laufs, nach 53 Tagen, wurden in Summe absteigend in der Gasphase folgende mittleren Kohlenstoffmengen gemessen: bei pH 7 (H₂/CO₂) 699,01 mg, bei pH 7 (N₂) 131,29 mg, bei pH 6 (H₂/CO₂) 108,65 mg und bei pH 6 (N₂) 75,53 mg. Dazu wurden die Kohlenstoffmengen von Methan und Kohlenstoffdioxid zusammengefasst.

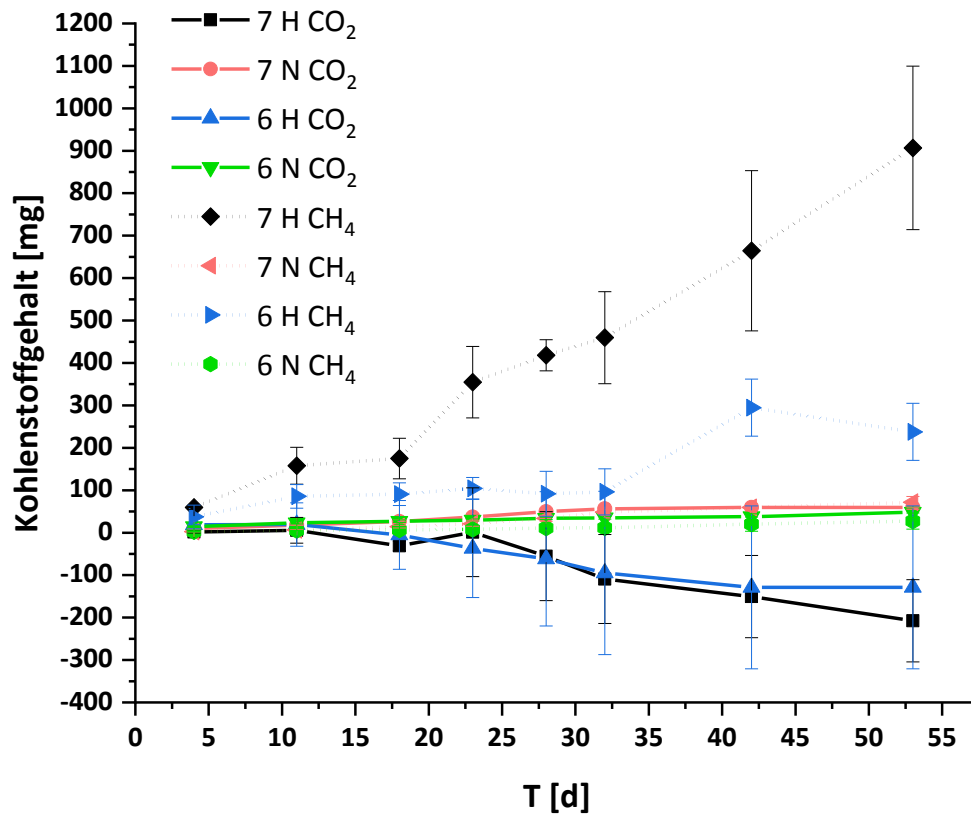


Abbildung 18: Kumulativer Kohlenstoffgehalt gebunden an CO₂ und CH₄ der Fermentation unter den Gasphasen H₂/CO₂ (H) und N₂ (N) bei pH 6 und pH 7. Die Mengen der Gase CO₂ (durchgängige Linie) und CH₄ (gepunktete Linie) wurden als Kohlenstoff [mg] angegeben. Die Werte sind fortlaufend dargestellt. Die Fermentation erfolgte mit dem bereits etablierten Abwasserinokulum der vorherigen Fermentationsansätze bei 30°C, 2% w/v Biomasse und 180 rpm.

FISH nach Gasphasen-Fermentation

Parallel zur Probennahme für die Illumina®-Sequenzierung wurden Proben zur Untersuchung über FISH genommen und fixiert. In Abb. 19 sind die FISH-Bilder von pH 6 und pH 7 unter N₂- und H₂/CO₂-Atmosphäre gezeigt. Es wurden Sonden verwendet, durch die Archaea mit grünen Fluoreszenz-Farbstoffen (FITC) und Bakterien über rote Farbstoffe (Cy3) detektiert und sichtbar gemacht werden konnten. Als Gegenfärbung wurden die Zellen mit DAPI gefärbt. Überschneidungen von DAPI und Bakterien-Signalen erschienen violett.

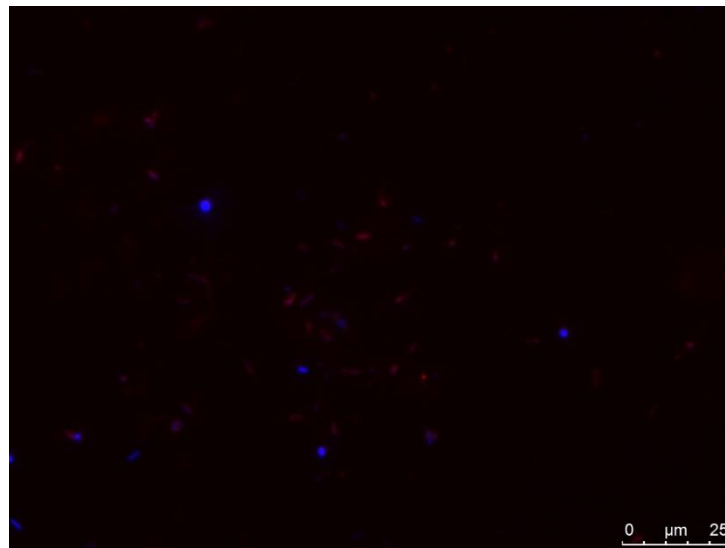
Zum Vergleich wurde eine FISH-Probe (Inokulum) gezeigt, die während eines vorangegangenen Laufs angefertigt wurde. Zur schnelleren Überprüfung wurden ebenfalls in

den zuvor durchgeführten Fermentationen FISH-Färbungen durchgeführt, um Archaea und Bakterien zu detektieren.

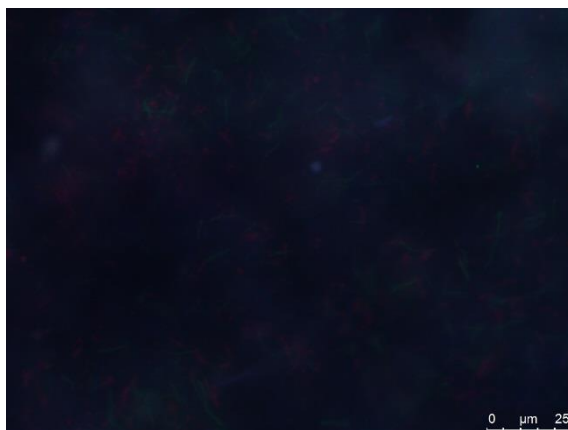
Als Größenstandard wurde eine Längenreferenz von 25 μm angegeben. In den als Inokulum verwendeten Kulturen wurden keine grün gefärbten Zellen, also Archaea, detektiert.

In den Proben der Gasphasen-Versuche wurden die Zellen sehr unterschiedlich gut angefärbt, da die in den Proben beinhaltete Cellulose die Farbstoffe teilweise abgefangen hatte. Erkennbar auf den Bildern durch unscharfe oder schwammige Strukturen. In allen Proben konnten Bakterien gut mit der Sonde angefärbt und detektiert werden. Etwas schwächer angefärbt wurden Zellen durch die grüne Archaea-Sonde, am besten zu sehen bei pH 6 und 7 H_2/CO_2 . Hinsichtlich der Diversität der Proben konnten dadurch jedoch keine Rückschlüsse gezogen werden.

Inokulum



pH 6

H₂/CO₂

pH 7

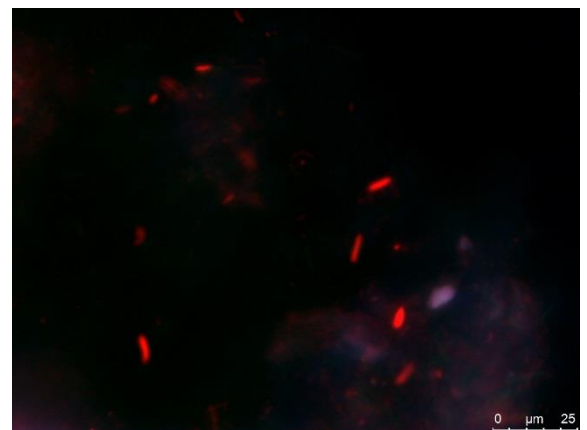
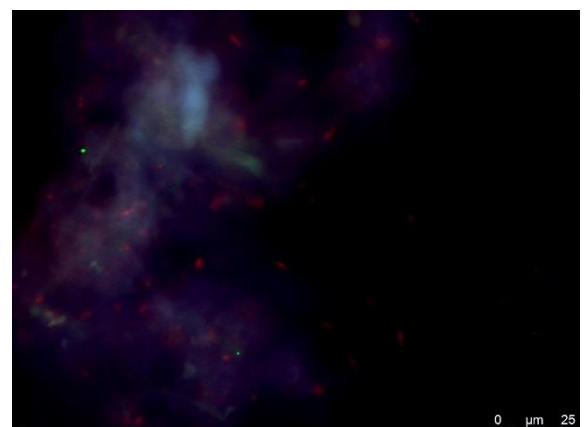
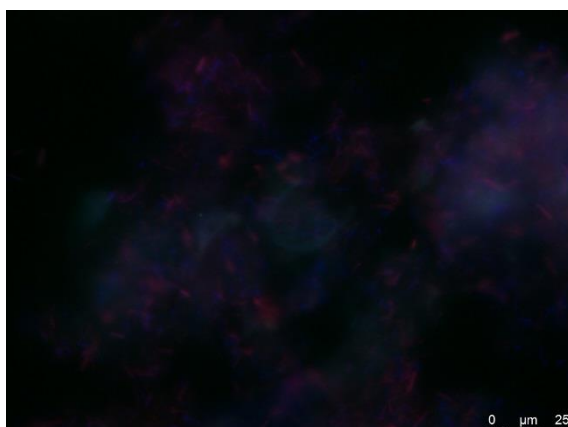
N₂

Abbildung 19: Exemplarische Bilder der FISH zur Detektion von Bakterien und Archaea. Die Bakteriensonde war mit einem roten Farbstoff (Cy3), die der Archaea mit einem grünen Fluoreszenzfarbstoff (FITC) gekoppelt. Als Gegenfärbung wurde die DNA mit DAPI (blau) gefärbt. Überlagerungen von rotem und blauem Signal erschienen violett. Als Größenreferenzen sind in 25 μm angegeben.

3.1.5. 16S Amplikon Analyse mittels IlluminaSeq®

Nach mehreren Überführungen sollte das mikrobielle Konsortium hinsichtlich seiner Zusammensetzung und der Stabilität untersucht werden. Dazu wurde nach dem ersten Versuch, der Fermentation von Holzpellets und Toilettenpapier bei pH 5, 6 und 7, jeweils eine gemischte Probe der Triplikate mittels IlluminaSeq® sequenziert. Die Sequenzierungsergebnisse wurden mit der Genomic Workbank der Software CLC bioinformatisch bearbeitet und die Sequenzen mittels Silva Datenbank bekannten Organismen zugeordnet. Aufgrund der Qualität der Identifizierung und der Sequenzen wurden die Bakterien bis zu den Ordnungen dargestellt (Abb. 20).

Auffällig war die große Vielfalt und Zusammensetzung der Fermentation bei pH 5 mit Holzpellets im Gegensatz zu den anderen Versuchen. Hier wurden fast zu gleichen Teilen die Ordnungen der Fusobacteriales (32,77%), Rhodobacterales (29,7%) und Bacteroidales (26,41%) gefunden. Die Fermentation der Holzpellets bei pH 6 und 7 führte zu über 80% Bacteroidales und als zweigrößte Ordnung Clostridiales (mit 9,83% bzw. 12,57%). Die drittgrößte Ordnung war hier den Enterobacteriales mit 2,8% und 2,99% zuzuordnen.

Unabhängig vom pH-Wert zeigte sich bei der Fermentation des Toilettenpapiers, dass die meisten Bakterien der Ordnung der Bacteroidales angehörten (pH 5: 71,47%; pH 6: 95,46% und pH 7: 89,57%). Die zweitgrößte Ordnung waren hier Bakterien der Clostridiales (12,4%; 2,42% und 6,9%). Bei pH 5 und pH 7 konnten als drittgrößte Ordnung Vertreter der Propionibacteriales (8,42% und 2,39%) gefunden werden. Bei pH 6 waren die Rhodospirillales die drittgrößte Ordnung mit 1,21%. Vertreter der Propionibacteriales wurden auch bei pH 7 mit Holzpellets als viertgrößte Ordnung gefunden.

Die Fermentationsansätze mit Pellets zeigten keine vom pH-Wert abhängigen Unterschiede. So konnten bei pH 5 3552 Sequenzen, bei pH 6 3601 Sequenzen und bei pH 7 3580 Sequenzen gefunden werden. In der Fermentation mit Papier war der Unterschied zwischen der Anzahl der detektierten Sequenzen größer. Bei pH 5 wurden 3719 Sequenzen, bei pH 6 7515 Sequenzen und bei pH 7 6749 Sequenzen.

Daneben wurde ebenfalls nach von Archaea gesucht. Diese konnten jedoch weder über die Sequenzierung noch über FISH gefunden werden.

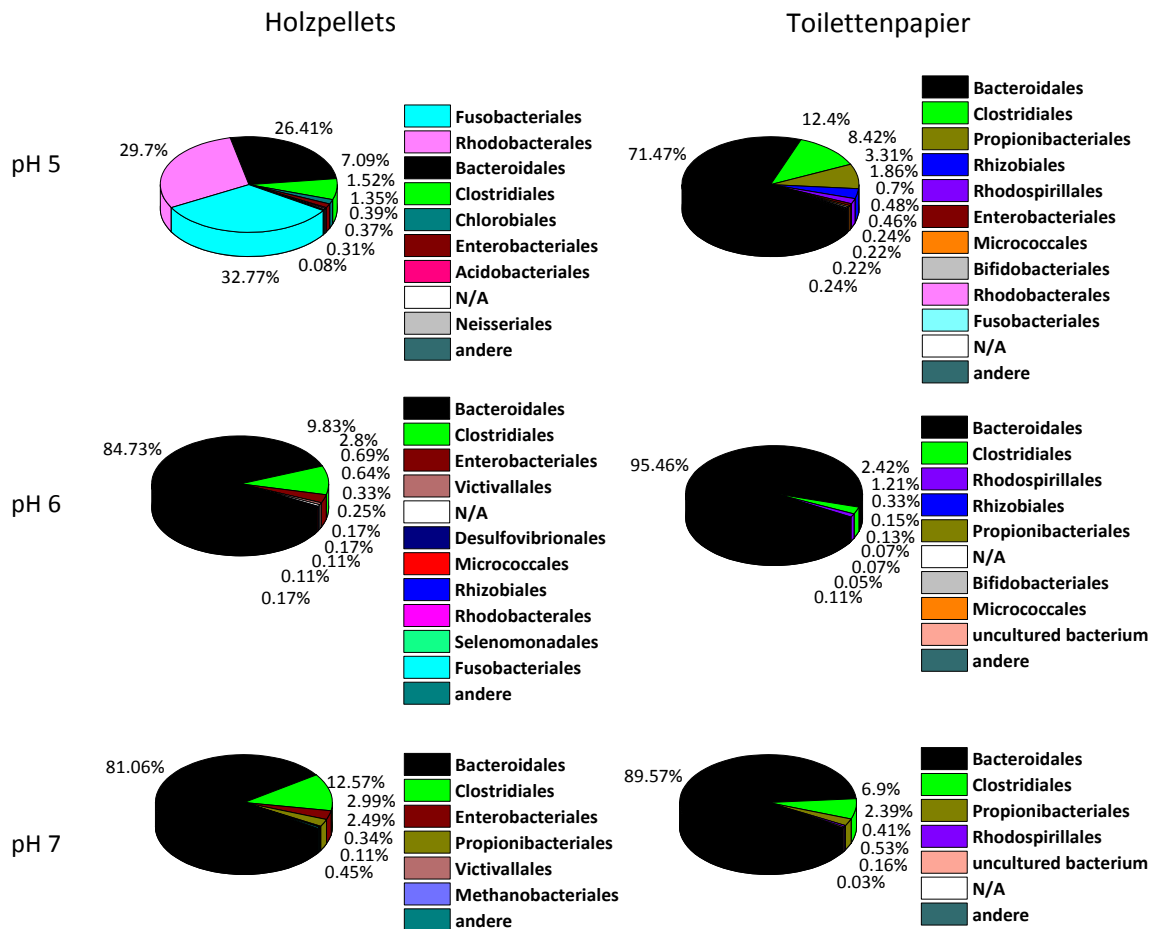


Abbildung 20: Verteilung der Bakterienordnungen der Fermentation von Holzpellets und Toilettenpapier bei den pH-Werten 5, 6 und 7. Die Legenden wurden absteigend nach der prozentualen Verteilung der gefundenen Bakterien-Ordnungen für jeden Ansatz angeordnet. Alle Ordnungen mit einem Auftreten von <0,1% wurden unter „andere“ zusammengefasst.

Zusammensetzung des Mikrobioms nach der Fermentation mit N₂ oder H₂/CO₂

Nach dem Versuch der Fermentation mit unterschiedlichen Gasphasen wurde erneut eine Illumina®-Seq durchgeführt. Hierbei wurden die Triplikate einzeln sequenziert und hinsichtlich der Zusammensetzung an Archaea und Bakterien wie zuvor beschrieben untersucht. Die bakterielle Zusammensetzung der Proben ist in Abb. 21 gezeigt. Beschriftet wurden die Ansätze mit dem pH-Wert und der jeweiligen Gasphase H für H₂/CO₂ (80/20) und N für Stickstoff (99%). Im Gegensatz zur ersten Fermentation hatte sich die Zusammensetzung nach etwa 3 Jahren verändert. In allen Ansätzen hatten sich Vertreter der Clostridiales, die zuvor die zweithäufigste Ordnung war, durchgesetzt. Mit 77-99% wurde diese zur häufigste Ordnung. Während im Inokulum mit 88% hauptsächlich Ruminococcaceae gefunden wurden,

wurden in allen Ansätzen nach der Fermentation vor allem Angehörige der Lachnospiraceae gefunden (Tab. 3.2). In den Ansätzen bei pH 7 unter Stickstoffatmosphäre wurden 33,3% jedoch mit einer Standardabweichung von 31,1% der Familie Ruminococcaceae zugeordnet. Clostridiaceae wurden unter Wasserstoffatmosphäre leicht erhöht im Gegensatz zur Stickstoffatmosphäre gefunden (pH 6: $16,7\% \pm 20,8\%$; pH 7: mit $10,2\% \pm 12,7\%$). Die Familie Christensenellaceae war selbst im Inokulum mit 0,5% sehr gering vertreten, in den Fermentationsansätzen konnten sich diese nicht mehr durchsetzen. In den Ansätzen pH 7 N, pH 7 H und pH 6 H wurden weniger als zwei Sequenzen und bei pH 6 N keine gefunden.

Bei pH 7 wurden unter beiden Gasphasen kaum Vertreter der Bifidobacteriales detektiert ($0,4\% \pm 0,2\%$ (H); $0,1\% \pm 0,05\%$ (N)). Hier zeigten sich unter der Wasserstoffatmosphäre $3,6\% \pm 6,3\%$ Micrococcales und mit $1,5\% \pm 1,9\%$ (H) mehr Vertreter der Selenomonadales als unter Stickstoffatmosphäre mit $0,2\% \pm 0,2\%$.

Bei pH 6 zeigte sich für beide Gasphasen eine ähnliche Verteilung der Bakterienordnungen. Unter einem Prozent waren Burkholderiales, Propionibacteriales und Micrococcales vertreten. Bifidobacteriales wurden mit $21,4 \pm 13,5$ bei Wasserstoffatmosphäre und $18,6 \pm 11\%$ bei Stickstoffatmosphäre detektiert. Vertreter der Selenomonadales lagen durch Fermentation bei Wasserstoffgasphase bei $1,1 \pm 0,8$ und unter Stickstoff bei $0,7 \pm 0,5\%$.

Wie schon bei der Fermentation zur Untersuchung des Einflusses des pH-Werts war hier der Unterschied zwischen den pH-Werten auf das Mikrobiom größer als der Einfluss der Gasatmosphäre.

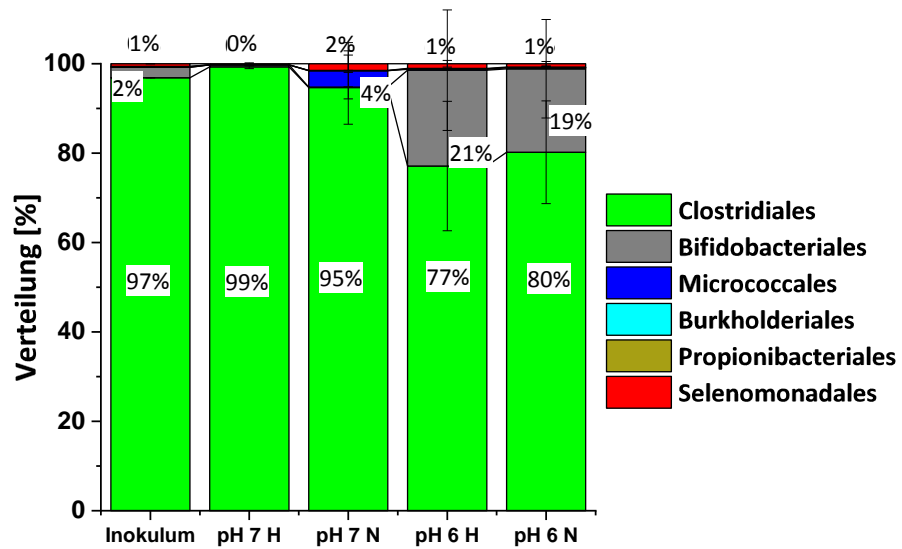


Abbildung 21: Verteilung der mittels Illumina® Seq identifizierten Bakterienordnungen unter verschiedenen Gaseinflüssen gegenüber dem Inokulum. Verwendet wurde ein Wasserstoff/Kohlendioxid-Gemischs (H) und Stickstoffs (N) bei den pH-Werten 6 und 7. Das Inokulum war ein Mischansatz der 2L-Ansätze. Die Proben wurden nach 60 Tagen Fermentation entnommen und analysiert.

Tabelle 3.2: Sequenzanzahl und prozentuale Verteilung der Bakterienordnungen unter H₂/CO₂- oder N₂ - Atmosphäre. Die Ordnung der Clostridiales wurde zudem in die Familien (grau) gesplittet gezeigt.

		Clostridiales					Bifidobacteriales	Micrococcales	Burkholderiales	Propionibacteriales	Selenomonadales	
		Lachnospiraceae	Ruminococcaceae	Clostridiaceae	Christensenellaceae	Eubacteriaceae						
Inokulum		3256,5 ± 265,1					79 ± 5,7	0	0	6 ± 0	20,5 ± 3,5	
	%	96,9 ± 0,02	116 ± 22,6 3,4 ± 0,4	2986 ± 219,2 88,8 ± 0,7	63,5 ± 5,5 1,9 ± 0,1	17 ± 0 0,5 ± 0,04	0	2,3 ± 0,02	0	0,2 ± 0,01	0	0,6 ± 0,1
pH 7 H ₂ /CO ₂		6306 ± 468,7	4712,7 ± 694,6	924,3 ± 781,9	655 ± 806,9	1,7 ± 1,2	0	26,7 ± 16,9	1,3 ± 1,5	0	1 ± 1	15 ± 17,8

	%	99,3 ± 0,4	73,9 ± 5,2	14,9 ± 13,4	10,2 ± 12,7	0	0	0,4 ± 0,2	0	0	0	0,2 ± 0,2
pH 7 N ₂		5384 ± 1743,5	2920,3 ± 1896,5	2092,7 ± 2135,9	1,3 ± 2,3	1,7 ± 1,5	0	6 ± 4	144,7 ± 249,7	0,7 ± 0,6	1,7 ± 1,2	66,3 ± 71,0
	%	94,7 ± 8,2	55,7 ± 35,4	33,3 ± 31,1	0	0	0	0,1 ± 0,05	3,6 ± 6,3	0	0	1,5 ± 1,9
pH 6 H ₂ /CO ₂		4175 ± 613,8	2775,5 ± 1801	405,5 ± 36,1	933 ± 1169,6	1 ± 1,4	1 ± 1,4	1179,5 ± 779,9	11 ± 8,5	3,5 ± 2,1	6 ± 4,2	58,2 ± 43,1
	%	77,1 ± 14,4	51,8 ± 35,3	7,5 ± 0,4	16,7 ± 20,8	0	0	21,4 ± 13,5	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,04	1,1 ± 0,8
pH 6 N ₂		5988 ± 1242,4	5424 ± 1690,7	467,33 ± 488,9	95 ± 161,9	0	0	1338 ± 693	18,3 ± 10,3	7,7 ± 13,3	2,7 ± 2,1	53,3 ± 31,8
	%	80,2 ± 11,5	72,3 ± 17,3	6,7 ± 7,3	1,2 ± 2	0	0	18,6 ± 11	0,3 ± 0,2	0	0,1 ± 0,2	0,7 ± 0,5

Im Gegensatz zur Sequenzierung des ersten Fermentationsversuchs wurden Sequenzen für Archaea gefunden. Die in Tabelle 3.3 dargestellte Verteilung zeigt, dass die dominierende Ordnung in allen Ansätzen die der Methanobacteriales war. Innerhalb der Archaea machten diese > 95% aus. Im Inokulum konnten mit 4,9 ± 0,5% auch Vertreter der Thermoplasmatales gefunden werden, die in den Fermentationsansätzen bei pH 7 mit einem 0,5%-igen (±0,3 bzw. ±0,5) Anteil und bei pH 6 mit 0,2% bzw. 0,1% gefunden wurden. Die im Inokulum mit 0,02% aufgetretenen Methanosarcinales konnten sich in den weiteren Ansätzen nicht durchsetzen und wurden in diesen nicht detektiert.

Die Anzahl der durch die Sequenzierung und bioinformatische Auswertung identifizierten Cluster wurde ins Verhältnis gesetzt. Dadurch wurden im Inokulum ein Verhältnis von 1:5 von Bakterien zu Archaea und in den Fermentationsansätzen 1:2,2 (pH 7 H), 1:1,9 (pH 7 N), 1:2,7 (pH 6 H), 1:1,3 (pH 6 N) gefunden. In allen Ansätzen konnten mehr Sequenzen den Archaea als den Bakterien zugeordnet werden.

Tabelle 3.3: Verteilung der Archaea nach der Fermentation von Papierhandtüchern bei pH 7 und pH 6 unter Wasserstoff/Kohlendioxid (H) oder Stickstoff (N) Atmosphäre. Die Anzahl der Sequenzen und die prozentuale Verteilung innerhalb der Archaea ist angegeben.

	Methanobacteriales	Thermoplasmatales	Methanosarcinales
Inokulum	15351 ± 77	788 ± 104	4 ± 1
%	95,1 ± 0,4	4,9 ± 0,5	0,02 ± 0
7,1 H	13407 ± 2840	74	0
%	99,5 ± 0,3	0,5 ± 0,3	0
7,1 N	10740 ± 1825	60 ± 60	0
%	99,5 ± 0,5	0,5 ± 0,5	0
6,1 H	14582 ± 1508	25 ± 22	0
%	99,8 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0
6,1 N	9409	11,7	0
%	99,9 ± 0,1	0,1 ± 0,06	0

Detektion von Pilz-DNA

Zum Nachweis von Pilzen in den Fermentationsansätzen, wurde eine Test-PCR durchgeführt. Dafür wurden die an homologe Bereiche der 5,8S rDNA von Pilzen bindenden Primer ITS1 und

ITS4 verwendet. Als Positiv-Kontrolle diente eine Pilz-Kultur aus dem Labor. Abhängig von der Art des Pilzes wurde bei einer positiven Probe ein PCR-Produkt von etwa 500 bp erwartet. Neben den Banden bei etwa 600 bp der zwei Positiv-Kontrollen konnte in den Proben keine DNA-Bande detektiert werden (Abb. 22). Demnach sollten keine Pilze in den untersuchten Fermentationsansätzen vorhanden sein.

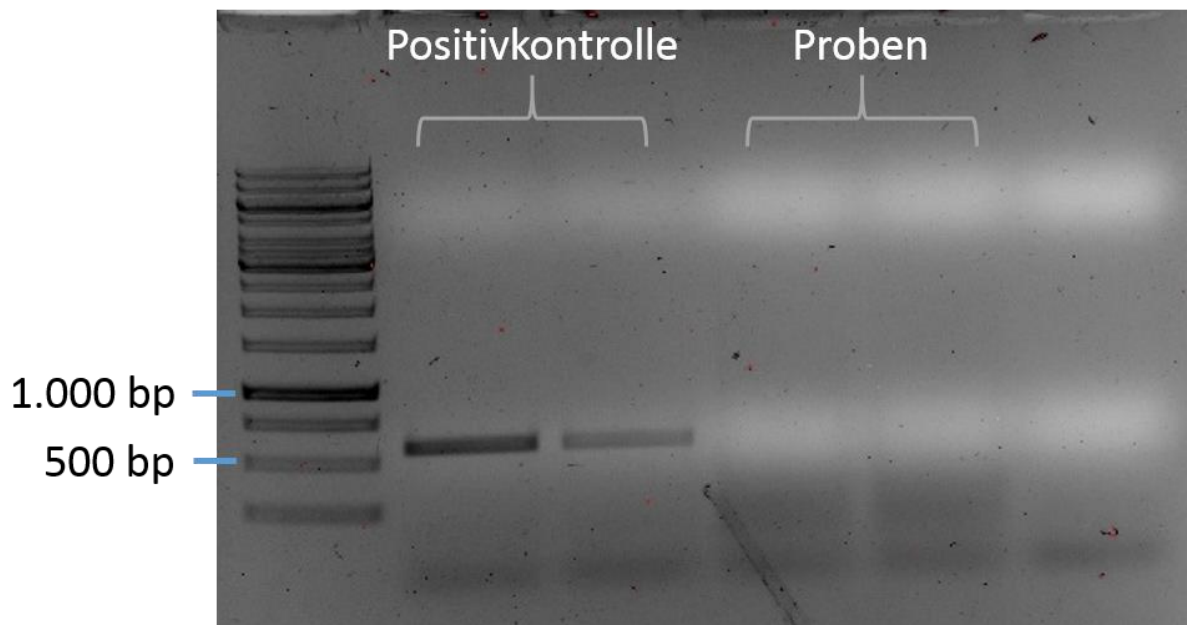


Abbildung 22: Gelbild der iproof-PCR zur Detektion von Pilz-DNA. Die Positiv-Kontrollen zeigten mit den verwendeten Primern für ITS1 und ITS4 jeweils eine Bande bei ca. 600 bp. In den eingesetzten Mischproben konnten unter den getesteten Bedingungen keine Pilz-DNA detektiert werden. Als Marker wurde ein 1 kb DNA Ladder verwendet.

3.2. Abreinigungsschritt im BES

Das entstandene Fermentat konnte in bioelektrochemischen Systemen unter Stromproduktion abgereinigt werden. Dabei wurden geeignete Bakterien bzw. Kokulturen gesucht, um gezielt eine oder mehrere der Hauptkomponenten Acetat, Propionat und Butyrat zu entfernen.

Das Fermentat wurde unsteril, mit der bereits beinhalteten bakteriellen Zusammensetzung, und steril verwendet. In Abb. 23 ist der Versuch mit unsterilem Fermentat zu sehen. Hier war über 30 Tage keine Stromproduktion detektierbar. Die beinhalteten organischen Säuren wurden ebenfalls nicht abgebaut. Zu diesem Zeitpunkt wurde Fermentat verwendet, bei dem über FISH noch keine Archaea detektiert werden konnten. Die im Fermentat vorhandenen Bakterien waren nicht in der Lage, die Elektrode als Elektronenakzeptor zu nutzen oder die

organischen Säuren anders anaerob zu verwenden. Da das sterile Fermentat die gleiche Stromkurve und Ergebnisse zeigte, wurde diese hier nicht gezeigt. Auch mit der Zugabe von 0,01% Hefeextrakt und der Verwendung von N_2 oder N_2/CO_2 war das Fermentationskonsortium nicht in der Lage, Elektronen auf die Anode zu übertragen und die Stromkurve verlief gleich der in Abb. 23 gezeigten Kurve.

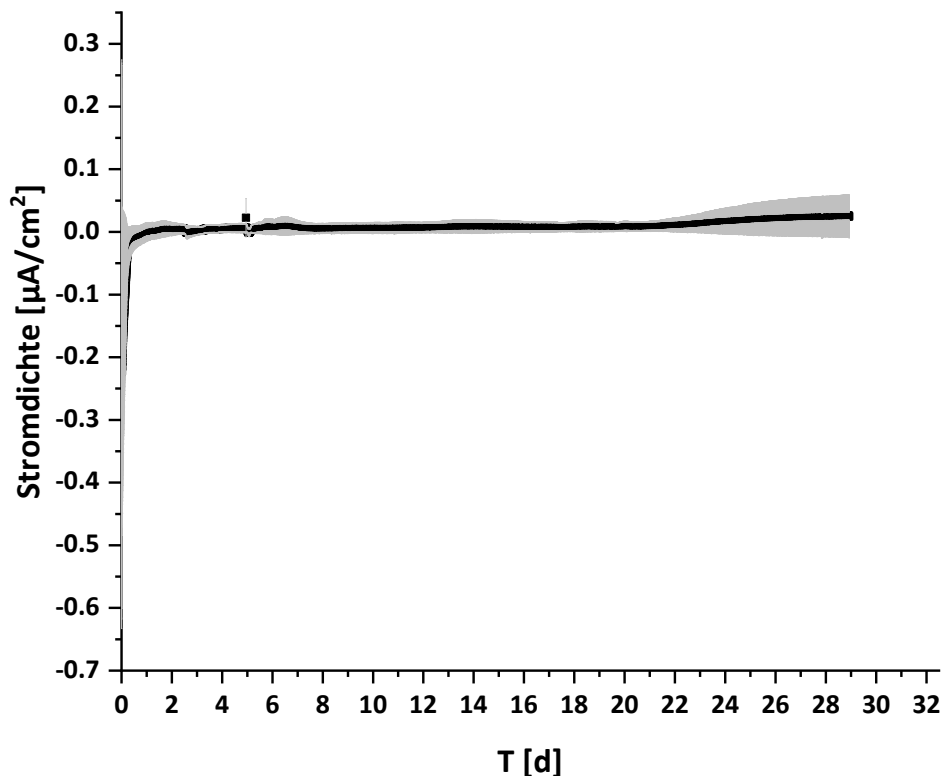


Abbildung 23: Stromdichte für die Versuche mit sterilem und unsterilem Fermentat bei N_2/CO_2 und N_2 Begasung und mit 0,01% Hefeextrakt. Da alle Kurven gleich verliefen, wurde hier nur eine gezeigt.

Nachdem die Bakterien im Fermentationsansatz nicht zur Stromproduktion befähigt waren, wurde nach einem geeigneten Konsortium gesucht. Das bereits im Material- und Methoden-Kapitel eingeführte Perkolat wurde hinsichtlich seines Potentials dafür getestet. Dazu wurden die verwendeten BES für zwei Wochen mit Perkolat bei -0,199 V gegen SHE (Amperometrie-Modus) gefahren. Im Anschluss wurde die Flüssigphase mit sterilem, filtriertem Fermentat gefüllt und der Versuch entsprechend gestartet. Getestet wurde Fermentat als Substrat im Chronoamperometrie-Modus, als *open circuit potential* und als Chronoamperometrie mit 50 μ M Bromo-Ethan-Sulfonat als Inhibitor für methanogene Mikroorganismen.

3.2.1. Amperometrie und OCP des Perkolatkonsortiums mit Fermentat

Um zu überprüfen, ob die Elektronenübertragung des mikrobiellen Konsortiums auf eine Anode erfolgt, wurde der gleiche Aufbau einmal als Amperometrie-Versuch und einmal mit einem *open circuit potential*, einem theoretisch unendlich großen Widerstand, getestet. Das Anodenkompartiment wurde mit Perkolat im Amperometrie-Modul vorinkubiert und im Anschluss mit sterilem Fermentat gefüllt und der Versuch gestartet. Während bei der Amperometrie das Potential, also die Spannung nahe der Anode, konstant gehalten wurde, konnten beim OCP durch den theoretisch unendlich großen Widerstand keine Elektronen auf die Anode übertragen werden. Dadurch wird überprüft, ob der Abbau von organischen Säuren an die Stromproduktion gekoppelt ist oder diese effektiv ebenfalls über andere Wege, als die Elektrodenatmung, abgebaut werden können.

Amperometrie-Versuche mit Fermentat als Substrat für das Perkolatkonsortium

Vorherige Versuche der Arbeitsgruppe zeigten, dass Acetat und Butyrat durch den Einsatz von Perkolat in einem BES von den enthaltenen Mikroorganismen abgebaut werden können. Im Rahmen einer Bachelorarbeit wurde ein Anodenmedium, welches Acetat, Butyrat und Propionat enthielt, mit Perkolat inokuliert. Dadurch konnte gezeigt werden, dass Acetat und Butyrat gleichzeitig abgebaut wurden. Der Propionatabbau begann erst verzögert, nachdem die anderen beiden organischen Säuren abgebaut waren. Über 12 Tage wurden Acetat und Butyrat abgebaut, ab Tag 17 begann in diesem Versuch der Abbau von Propionat, sodass nach etwa 25 Tagen sowohl der gesamte TOC als auch alle organischen Säuren abgebaut waren. Acetat wurde durchschnittlich mit 3 mM/d, Butyrat mit 1,5 mM/d und Propionat mit 1,8 mM/d abgebaut. Der gemessene TOC zeigte eine mittlere Abbaurate von 0,13 g/l*d. Mit Medium konnte eine maximale durchschnittliche Stromdichte von 127 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ erreicht werden. Dadurch ergab sich eine Coulomb-Effizienz von 11%.

Für die weiteren Versuche wurde das Perkolat zunächst über einen Amperometrie-Versuch an die Anode adaptiert. Exemplarisch für die Vorinkubationen ist eine Stromkurve in Abb. 24 gezeigt.

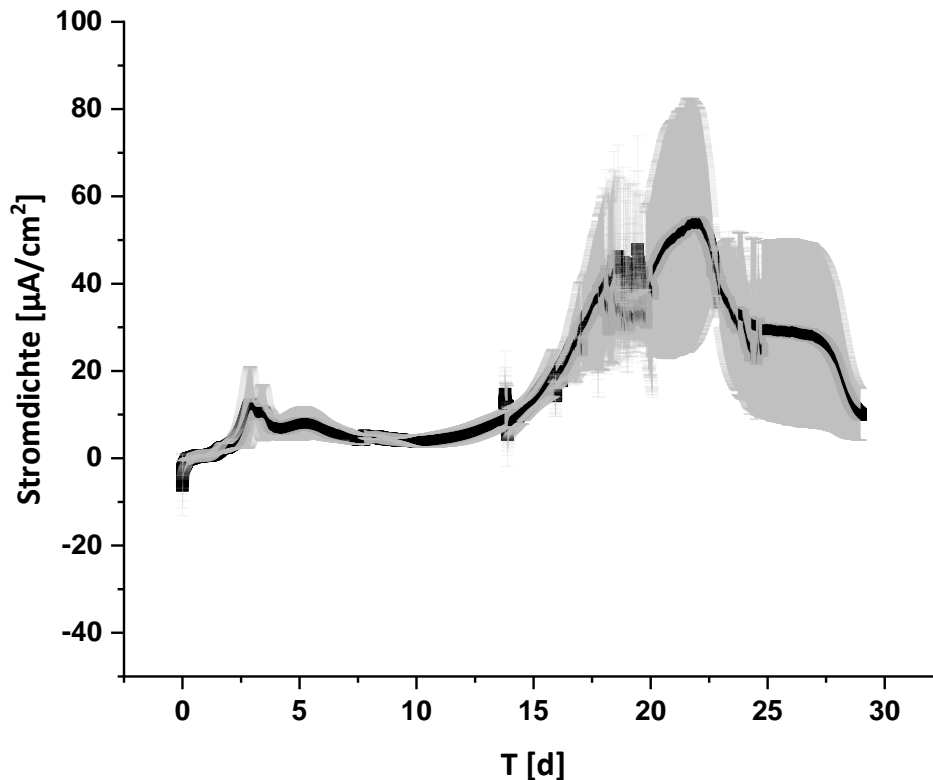


Abbildung 24: Exemplarische Kurve einer mittleren Stromdichte für die Vorinkubationen der Anoden mit Perkolat. Die Standardabweichung wird in grau dargestellt.

Je nach Charge des Perkolats variierte die Anlaufphase der Stromkurve zu Beginn des Laufs. Nach dem Abflachen des Strompeaks waren, wie bereits im Versuch mit Medium zuvor, Acetat und Butyrat abgebaut, wohingegen Propionat verblieb. Die maximale durchschnittliche Stromdichte lag mit Perkolat bei $54 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Durchschnittlich konnte bei der Vorinkubation über den TOC-Abbau eine Coulomb-Effizienz von 4-10% erreicht werden.

In Abb. 25 ist das Potential des OCP-Versuchs und die mittlere Stromdichte eines Amperometrietriplikats mit Fermentat gezeigt. Das Potential während des OCP-Laufs pendelte sich bei ca. -320 mV ein. Für den Amperometrierversuch zeigte sich wieder das charakteristische Stromdichtenprofil wie zuvor. Dabei werden unter Stromproduktion zunächst Acetat und Butyrat abgebaut. Zum Zeitpunkt des vollständigen Abbaus dieser organischen Säuren, endet auch der Strompeak. Wie in diesem Versuch nach ca. 12 Tagen (Abb. 25 (B)).

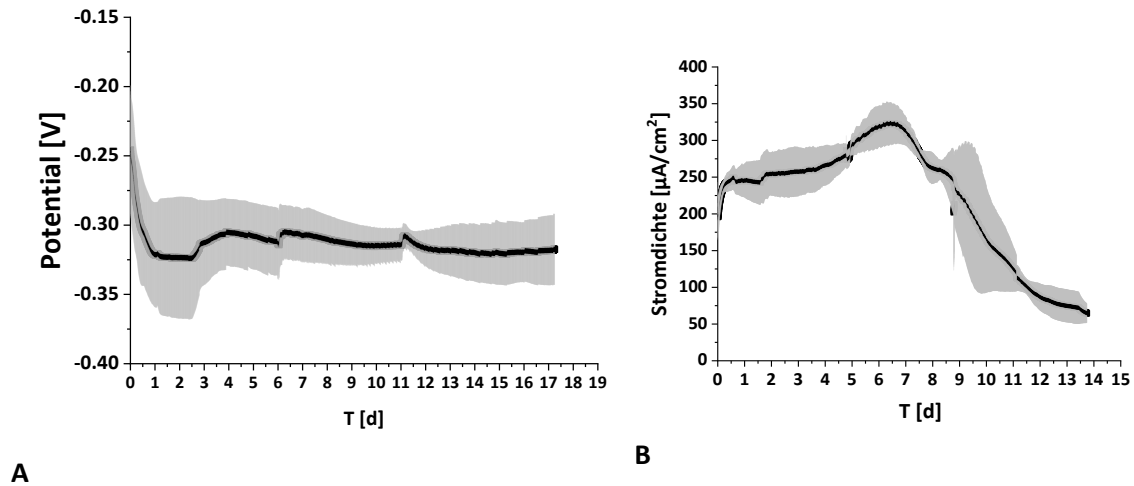


Abbildung 25: Potential des *open circuit potential*-Laufs (A) und mittlere Stromdichte eines Amperometrie-Experiments (B) mit Fermentat und Percolat-Konsortium. (A) OCP: Über 17 Tage pendelte sich das Potential bei etwa -320 mV ein. (B) Amperometrie: Das Potential wurde auf -191 mV gegen Ag/AgCl gesetzt. Die Standardabweichungen wird in grau gezeigt.

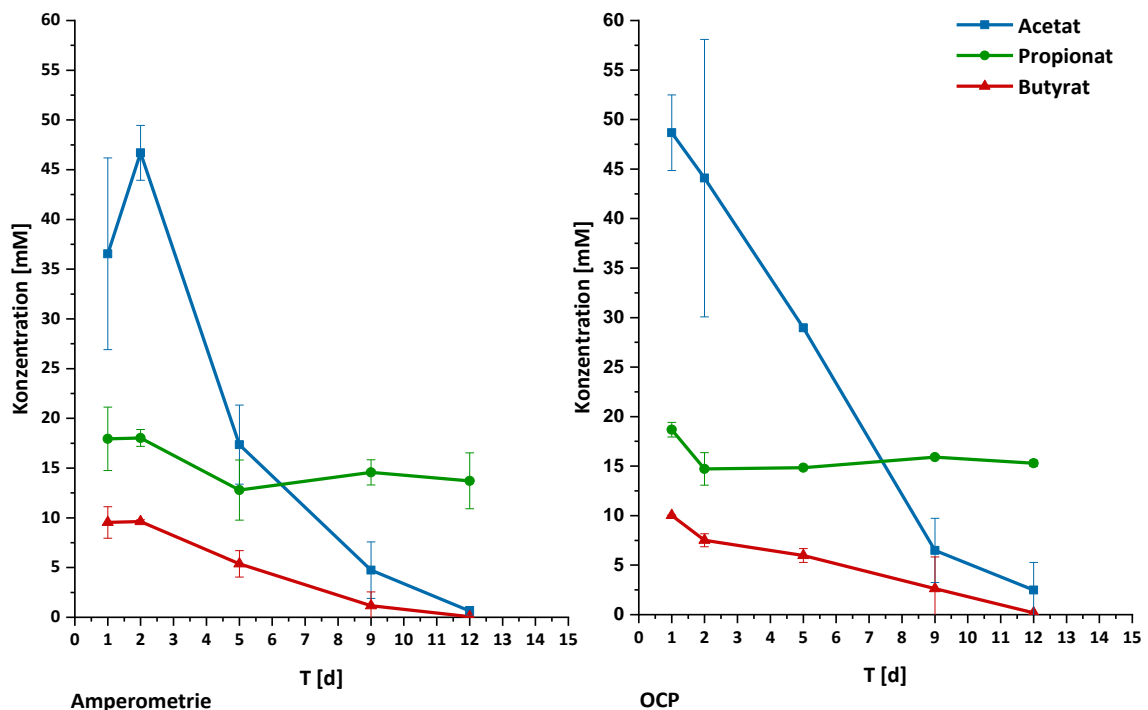


Abbildung 26: Abbau der organischen Säuren aus Fermentat im Amperometrie-Modus (links) und im OCP-Modus rechts. An der mit Percolat vorinkubierten Anode wurde der Abbau mit und ohne Elektronenübertragung über 12 Tage beobachtet.

Unabhängig, ob Elektronen übertragen werden konnten oder, wie im OCP-Modus, nicht wurden Acetat und Butyrat von Beginn an abgebaut, während Propionat nicht abgebaut wurde. Die Abbaurate von Acetat im Amperometrie-Versuch waren 4,3 mM/d, im OCP-Versuch 3,9 mM/d. Die Abbaurate des TOC lag in beiden Modi bei 0,2 g/d. Wobei in beiden Modi keine signifikanten Unterschiede in den Abbauraten festgestellt werden konnten.

Während des Amperometrieversuchs konnte eine maximale mittlere Stromdichte von $320 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ gemessen werden. Errechnet aus den frei gewordenen Elektronen durch den Abbau des TOCs konnte hier eine mittlere Coulomb-Effizienz von 6% erreicht werden.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob die Aktivität von methanogenen Mikroorganismen im Amperometrie-Versuch mit Zugabe von $50 \mu\text{M}$ Bromo-ethan-Sulfonat gehemmt werden können und dadurch die Stromdichte und damit die Coulomb-Effizienz gesteigert werden. Dazu wurde der gleiche Aufbau wie des Amperometrie-Versuchs zuvor gewählt. Nach der Adaptation wurde steriles Fermentat mit $50 \mu\text{M}$ Bromo-Ethan-Sulfonat versetzt dazugegeben. Im Verlauf dieses Versuchs entstanden die in Abb. 27 einzeln für die Triplikate gezeigten Stromdichten über 10 Tage. Gemittelt wurde eine Stromdichte von $55 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ erreicht. Die im Anschluss ausgewerteten organischen Säuren zeigten jedoch keine Abnahme. Daher war es hier nicht möglich, den Abbau von Acetat und Butyrat mit dem Perkolat-Konsortium und Bromo-Ethan-Sulfonat effektiver durchzuführen. Dadurch, dass keine Abnahme des organischen Kohlenstoffs gemessen werden konnte, war eine Kalkulation der Coulomb-Effizienz nicht möglich.

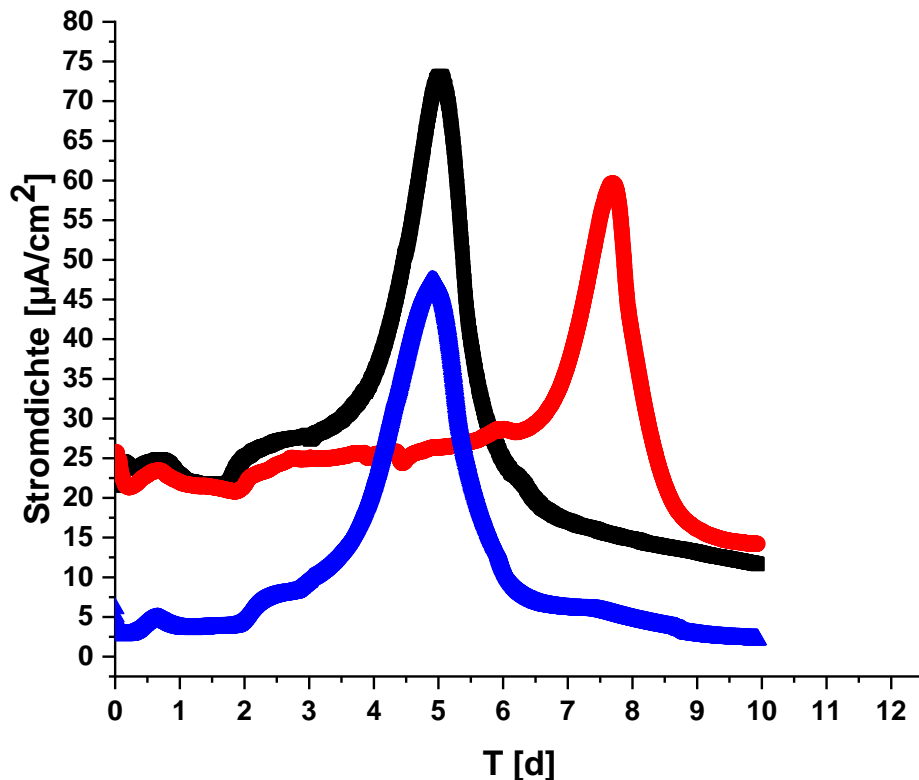


Abbildung 27: Mittlere Stromdichten des Perkolat-Konsortiums mit sterilem Fermentat und 50 µM Bromo-Ethan-Sulfonat. Da die Versuche zu unterschiedlichen Zeitpunkten ihre maximale Stromdichte erreichten, sind die Triplikate einzeln gezeigt. Durch die Inhibierung der Methanogenese sollte die Coulomb-Effizienz gesteigert werden.

3.2.2. Abbau von Fermentat mit *Geobacter sulfurreducens*

Nachdem die organischen Säuren Acetat und Butyrat mittels Perkolat-Konsortium unter Stromproduktion abgereinigt werden konnten, sollte untersucht werden, ob Acetat allein abgebaut werden kann. Dazu wurde als Biokatalysator *Geobacter sulfurreducens* verwendet. Nach der Vorkultivierung in Fumarat-Medium wurde eine gut gewachsene Kultur ($>OD_{600nm} 6$) an der Anode für 7-14 Tage im Amperometrie-Modus mit Anodenmedium vorinkubiert. Im Anschluss wurde Fermentat als Substrat getestet.

Exemplarisch ist in Abb. 28(A) die mittlere Stromdichtekurve einer Vorinkubation über 18 Tage gezeigt. Hierbei wurde etwa die Konzentration der organischen Säuren eines durchschnittlichen Fermentats eingesetzt. So wurden von Acetat ca. 40 mM und von Propionat und Butyrat 20-30 mM verwendet.

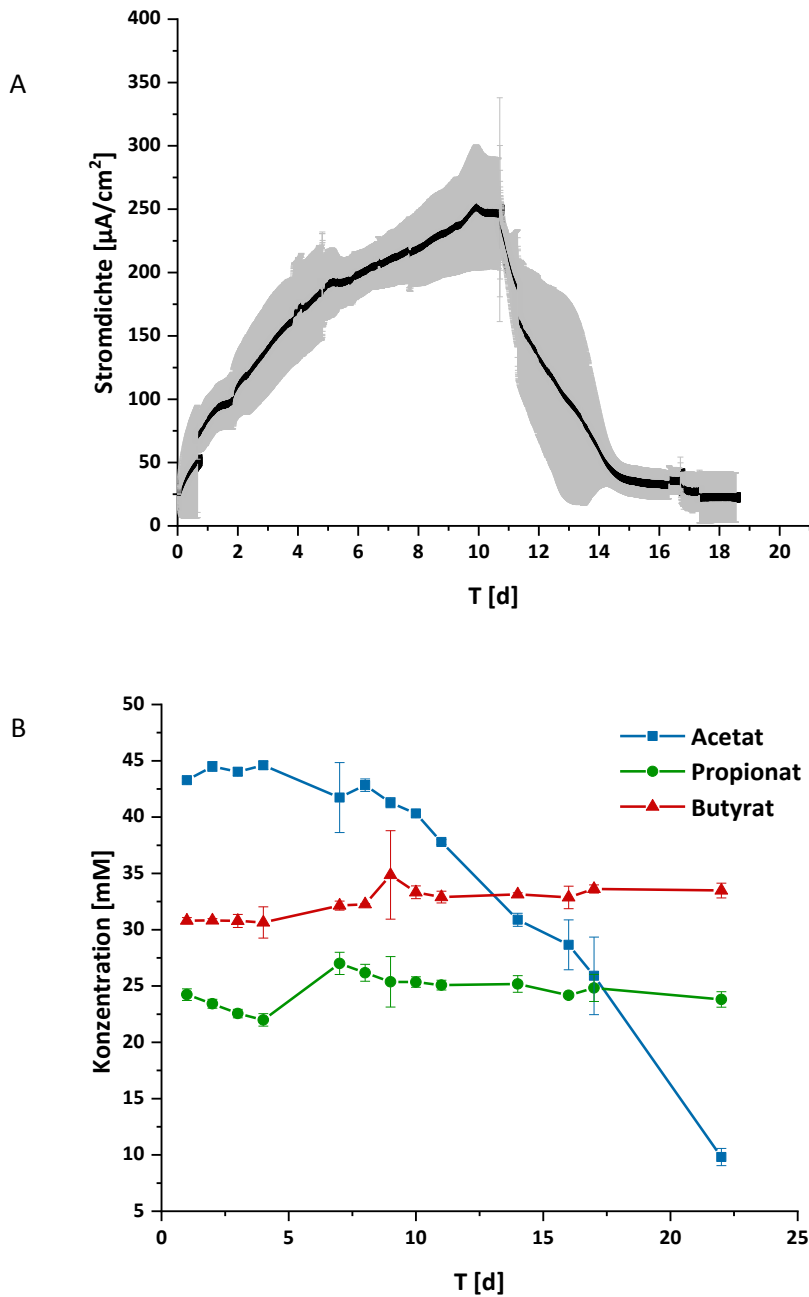


Abbildung 28: Abbau von organischen Säuren und Stromproduktion mit *Geobacter sulfurreducens* aus Medium. (A) Die mittlere Stromdichte wird für 18 Tage gezeigt. Der Standardfehler ist grau dargestellt. (B) Abbau von Acetat, während Propionat und Butyrat im Anodenmedium verbleiben. Der Abbau wurde unter N_2/CO_2 -Atmosphäre, bei 30°C und das Potential auf -191 mV gegen Ag/AgCl gesetzt.

Mit *G. sulfurreducens* in Anodenmedium konnte eine maximal mittlere Stromdichte von $250\ \mu\text{A}/\text{cm}^2$ erreicht werden. In diesem Versuch wurde gezeigt, dass *Geobacter sulfurreducens* nur das beinhaltete Acetat und nicht die anderen beiden Säuren, Propionat und Butyrat, unter optimalen Bedingungen mit Anodenmedium abbauen kann (Abb. 28(B)). Nachdem Acetat abgebaut wurde, endete ebenfalls die Stromproduktion. Sowohl Butyrat als auch Propionat

verblieben stabil im Medium und dienten selbst nach dem Abbau von Acetat nicht als Elektronendonator.

Die mittlere Abbaurate von Acetat betrug in den Vorinkubationsversuchen zwischen 1,8 und 2,8 mmol/d. Je nach Abbaurate und Versuch wurden 22-41% Coulomb-Effizienz erreicht.

Acetatabbau aus Fermentat mit *G. sulfurreducens*

Nachdem die Anoden mit Medium für 7-14 Tage vorinkubiert wurden, wurde das Medium mit Fermentat ausgetauscht. Für die Vorinkubation der Versuche mit Fermentat und *G. sulfurreducens* wurde das Anodenmedium nur mit Acetat versetzt verwendet. Im Gegensatz zu den Versuchen mit Medium musste bei der Verwendung mit Fermentat der pH-Wert im Abstand von 1 - 2 Tage wieder auf pH 7 eingestellt werden. Diese pH-Anpassungen waren in der Kurve der mittleren Stromdichte (Abb. 29 (A)) durch Schwankungen zu sehen. Wie in Abb. 29(A) dargestellt, konnte *G. sulfurreducens* Strom aus Fermentat produzieren. Die mittlere Stromdichte lag bei maximal 200 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$. Dabei war die Stromproduktion u.a. abhängig vom pH-Wert. Wie in der Kurve zu sehen schwankte dieser am Anfang des Versuchs und ab Tag 17. Wenn der pH-Wert auf 7 eingestellt wurde, stieg die Stromkurve wieder an. Mit Fermentat konnte ein mittlerer Abbau von Acetat von 1 - 1,6 mmol/d erreicht werden. Hierbei konnten durchschnittlich 70 mg/l*d TOC abgebaut werden. Wie schon in den Versuchen mit Medium konnte nur der Abbau von Acetat beobachtet werden, während Propionat und Butyrat im Fermentat verblieben. Die maximale Coulomb-Effizienz lag hier, vergleichbar zu den Versuchen mit Medium, bei 42%.

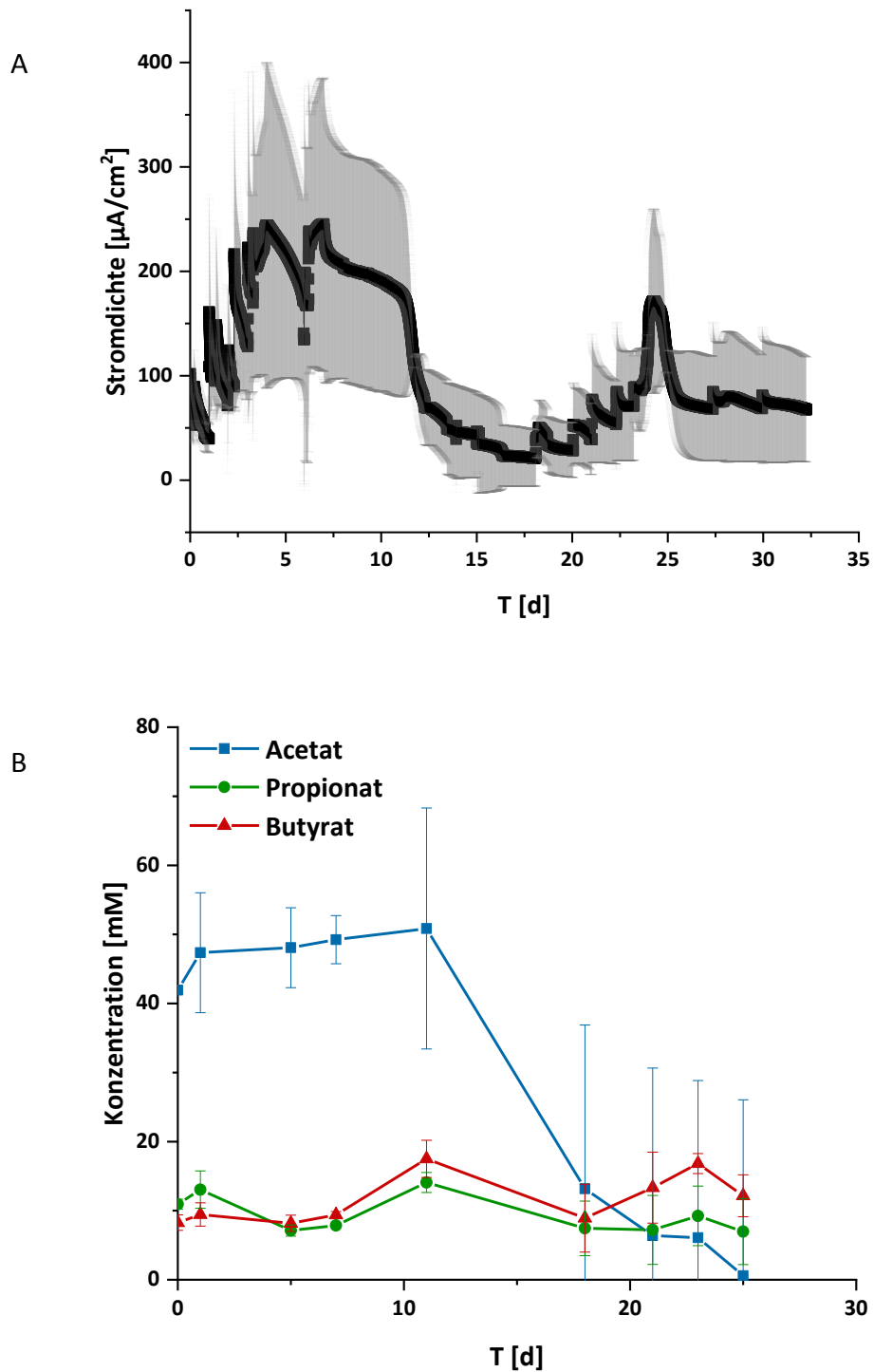


Abbildung 29: Acetatabbau in Fermentat unter Stromproduktion mit *G. sulfurreducens*. (A) Stromdichte eines Triplikats. Der Standardfehler ist grau angegeben. (B) Konzentration der organischen Säuren Acetat, Propionat und Butyrat über die Versuchslaufzeit.

3.3. Nanofiltration

Je nach Fermentatansatz wurden weniger als 15 mM Propionat in den BES-Versuchen eingesetzt. Um im Anschluss Wachstumskurven mit höheren Konzentrationen durchführen zu können oder einen konzentrierten Stock zu erstellen, wurde getestet, ob die organischen Säuren, insbesondere Propionat, ankonzentriert werden können.

Dazu wurde zum einen eine Bachelorarbeit am Institut für Wasserchemie des KIT und weitere Untersuchungen innerhalb dieser Arbeit angefertigt. Die zu untersuchenden Fermentat-Proben wurden vorher mittels Glasfaserfilter und CrossFlow-Anlage schrittweise bis zu 0,2 µm filtriert. Es wurde eine NF 90 Membran der Firma DOW verwendet. Zwei Proben (Fermentat pH 6 und pH 7 mit Acetat, Propionat und Butyrat) wurden für etwa 90 min ankonzentriert, bis sich der Permeatfluss von 9 ml/min auf 5 ml/min etwa halbiert hatte. Der pH-Wert blieb dabei konstant. Die elektrische Leitfähigkeit verdoppelte sich nahezu bei pH 6 von 3,64 mS/cm auf 6,23 mS/cm und bei pH 7 von 4,82 mS/cm auf 8,01 mS/cm. Der Rückhalt bei pH 6 lag gemittelt bei 88% TOC, bei pH 7 bei 85% TOC. Aufgetrennt auf die organischen Säuren konnten im Fermentat bei pH 6 die Konzentration von Acetat knapp um den Faktor 1,5, für Propionat um den Faktor 2 und für Butyrat um den Faktor 2,6 höher konzentriert werden. Bei pH 7 wurde die Konzentration von Acetat auf das 1,9-fache, von Propionat das 1,8-fache und von Butyrat auf das 2,8-fache erhöht. Daneben wurde die Konzentration verschiedener Salze überwacht. Dabei zeigte sich, dass Calcium, Kalium, Magnesium und Natrium ebenfalls über diese Membranfiltration ankonzentriert werden. Im Mittel wurden diese etwa verdoppelt (s. Anhang Tab. A2).

In einem weiteren Versuchen wurden in einer Amplikon-Rührzelle zugeschnittene NF90- und NF270-Membranen mit bis zu 4,5 bar hinsichtlich ihres Rückhalts getestet. Die Zahl (90 oder 270) gibt dabei ein Indiz auf den Rückhalt liefern, sodass bei der Membran NF90 theoretisch kleinere Moleküle zurückgehalten werden sollten, als mit der Membran NF270. In diesen Versuchen wurde das Volumen des zu untersuchenden Fermentats mittels Überdruck mit Stickstoffbegasung halbiert und im Anschluss der Rückhalt analysiert. Das eingesetzte Fermentat nach einem BES-Lauf wurde 0,2 µm filtriert und autoklaviert verwendet. Durch die vorangegangene Abreinigung im BES enthielt es vor allem Propionat.

Wie in Tabelle 3.4 dargestellt wurden die im eingesetzten Fermentat enthaltenen organischen Säuren durch die Verwendung der Membranen NF90 und NF270 unterschiedlich zurück gehalten. Mit der NF 90 Membran konnte die Acetat-Konzentration verdoppelt und dadurch

ein Rückhalt von 100% erreicht werden, wohingegen 82% Propionat und 41% Butyrat zurück gehalten wurden. Die Werte der im Durchfluss gemessenen Konzentrationen stimmen bei Propionat mit den anderen Messergebnissen überein. Bei Acetat dürfte nach einem 100%-igem Rückhalt kein Acetat im Durchfluss gemessen werden, jedoch wurde eine Konzentration von 1,21 mM erhalten. Die Butyrat-Konzentrationen des Fermentats, des Durchflusses und des Konzentrats lagen etwa im gleichen Bereich (1,15 bis 1,42 mM), daher konnte hier keine Ankonzentrieren festgestellt werden.

Mit der NF 270 Membran wurde ein Fermentat (nach dem OCP-Lauf) verwendet, das kein Butyrat und Acetat enthielt. Die für Acetat gemessenen Mengen lagen mit < 1 mM unter der Nachweisgrenze der verwendeten HPLC. Die Propionatkonzentrationen in Durchfluss und Konzentrat stimmten hier wiederum gut mit der Konzentration des eingesetzten Fermentats überein. Dabei konnte ein Rückhalt von 84% erreicht werden. Es wurden 11,22 mM im Fermentat, 18,89 mM im Konzentrat und 3,99 mM im Durchfluss gemessen.

Bezüglich des Rückhalts der organischen Säuren, insbesondere Propionat, konnte kein Unterschied zwischen den getesteten Membranen festgestellt werden. Die Filtration mit der NF 90 Membran lief über einen Zeitraum von über 24 Stunden, während die Verwendung der NF 270 Membran innerhalb von vier Stunden zur gewünschten Halbierung führte.

Tabelle 3.4: Konzentrationen und Rückhalt von organischen Säuren in Fermentat durch die Nanofiltration mit den Membranen NF 90 und NF 270 bei einem Überdruck von etwa 4,5 bar durch Stickstoff.

	Acetat [mM]	Propionat [mM]	Butyrat [mM]
NF 90			
Fermentat	2,14	10,30	1,42
Konzentrat	4,34	16,81	1,15
Durchfluss	1,21	5,24	1,23
Rückhalt [%]	100%	82%	41%
NF 270			
Fermentat	0	11,22	0
Konzentrat	0	18,89	0
Durchfluss	0	3,99	0
Rückhalt [%]	-	84%	-

3.4. Fermentat als Substrat

Das im bioelektrochemische System abgereinigte, sterile Fermentat sollte weiterhin als Kultivierungsflüssigkeit untersucht werden. je nach vorangegangenen BES-Lauf stellten Propionat und gegebenenfalls zusätzlich Butyrat das organische Substrat dar. Das Fermentat wurde abhängig vom eingesetzten Organismus aerob oder anaerob steril vorbereitet und gegebenenfalls komplementiert.

Alle Wachstumsversuche wurden mit einer OD_{600nm} 0,1 gestartet.

3.4.1. Wachstum von *Shewanella oneidensis* und *Geobacter sulfurreducens*

Zunächst wurde Fermentat als Kultivierungsflüssigkeit mit *S. oneidensis* aerob und mit *G. sulfurreducens* anaerob getestet. Das Wachstum im BES konnte mit *G. sulfurreducens* nicht planktonisch bestimmt werden, da die meisten Zellen auf der Anode saßen. Daher wurde das Wachstum hier in Anaerobflaschen mit zugesetztem Fumarat überprüft. Als Positivkontrollen wurde das Kultivierungsmedium für *G. sulfurreducens* und für *S. oneidensis* PBS gewählt.

Das Fermentat wurde für *Geobacter sulfurreducens*, wie das Medium anaerobisiert, und jeweils mit 40 mM Fumarat als Elektronenakzeptor, Carbonatpuffer und Komplementationslösungen versetzt. Zudem wurde der pH-Wert auf 7 eingestellt. Ebenso wurde auch das Fermentat für die Kultivierung von *S. oneidensis* vorbereitet, jedoch verblieb dieses aerob. Hier wurde ein Phosphatpuffersystem eingesetzt. Um zu überprüfen, ob die Zugabe von Hefe (0,1%) benötigt wird, wurde es als Vergleich zugesetzt getestet.

Für diese Versuche wurde Fermentat mit Acetat, Propionat und Butyrat verwendet, um deren Abbau mit den verwendeten Bakterien zu überprüfen.

Sowohl in der Positivkontrolle, als auch in den Ansätzen mit Fermentat (+/- 0,1% Hefeextrakt) wurde von beiden Bakterien nur Acetat abgebaut. *S. oneidensis* zeigte in den meisten Versuchen (je nach Batch des Fermentats), wie in Abb. 30 zu sehen, kein Wachstum. Das Wachstum war in der Positivkontrolle am höchsten. Hier wurde eine maximale Wachstumsrate von $\mu=0,25$ und eine Verdopplungszeit von durchschnittlich 2,8 h gemessen. In den Ansätzen mit Fermentat wurde mit $\mu=0,02$ und einer Verdopplungszeit von 45 h ein sehr langsames Wachstum detektiert, wobei mit Hefeextraktzugabe eine Wachstumsrate von $\mu=0,18$ und eine Verdopplungszeit von 3,8 h erreicht wurde.

Die Abbaurrate lag in der Positivkontrolle bei 1,4 mM/h. In beiden Ansätzen mit Fermentat wurde eine Abbaurrate von 0,33 mM/h erreicht.

Ein ähnlicher Abbau zeigte sich bei *Geobacter sulfurreducens*, bei dem die Positivkontrolle das beste Wachstum zeigte. Hierbei wurde eine maximale Wachstumsrate von $\mu=0,74$ und eine Verdopplung von 0,9 Tagen erreicht. In Fermentat mit Hefeextrakt wurde ein besseres Wachstum als in Fermentat beobachtet, wobei sich die gleiche End-OD von 0,5 in beiden Ansätzen einstellte. Mit Fermentat ergab sich eine Wachstumsrate von $\mu=0,26$ und eine Verdopplungszeit von 2,6 Tagen. Mit Hefezusatz wurde $\mu=0,42$ und eine Verdopplungszeit von 1,6 Tagen erreicht.

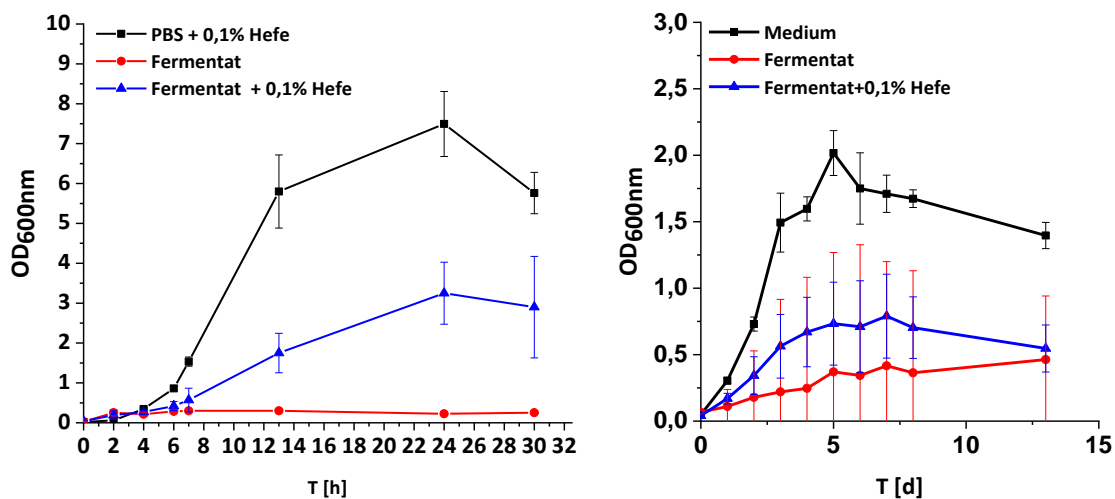


Abbildung 30: Optische Dichte während der Wachstumsversuche in Fermentat mit und ohne 0,1% Hefeextrakt von *Geobacter sulfurreducens* und *Shewanella oneidensis*. Schwarz stellt die Positiv-Kontrolle, blau das Fermentat mit 0,1% Hefeextrakt und rot das Fermentat als Kulturmedium dar.

Verwendung von *Shewanella oneidensis* #1039 zur Acetoin-Produktion aus Fermentat

Nachdem das Wachstum von *Shewanella* mit Hefezusatz in Fermentat gezeigt wurde, sollte untersucht werden, ob mit einem dazu befähigten Stamm aus Propionat, bzw. den im Fermentat enthaltenen Säuren, Acetoin produziert werden kann.

Dazu wurde ein von Bursac *et al.* (Bursac *et al.*, 2017) modifizierter *S. oneidensis*-Stamm (#1039; Δ ackA Δ pta mit pBAD_alsSD) verwendet. Zum Einsatz kam ein PBS-Medium mit Propionat (15 mM) als Kohlenstoffquelle, während im Fermentat Acetat (50 mM), Propionat (15 mM) und Butyrat (12 mM) vorhanden waren. Wie in Abb. 31 gezeigt, konnte das eingesetzte Fermentat mit Hefezusatz im Gegensatz zum PBS Medium zu einem höheren Wachstum führte. Die maximale Wachstumsrate lag hier bei $\mu=0,15$ und einer Verdopplungszeit von 4,5 Stunden. Mit PBS-Medium wurde ein $\mu=1,3$ und eine

Verdopplungszeit von 5,4 Stunden verzeichnet, während das Fermentat allein zu einer Wachstumsrate von $\mu=0,1$ und einer Verdopplungszeit von 7,2 Stunden führte.

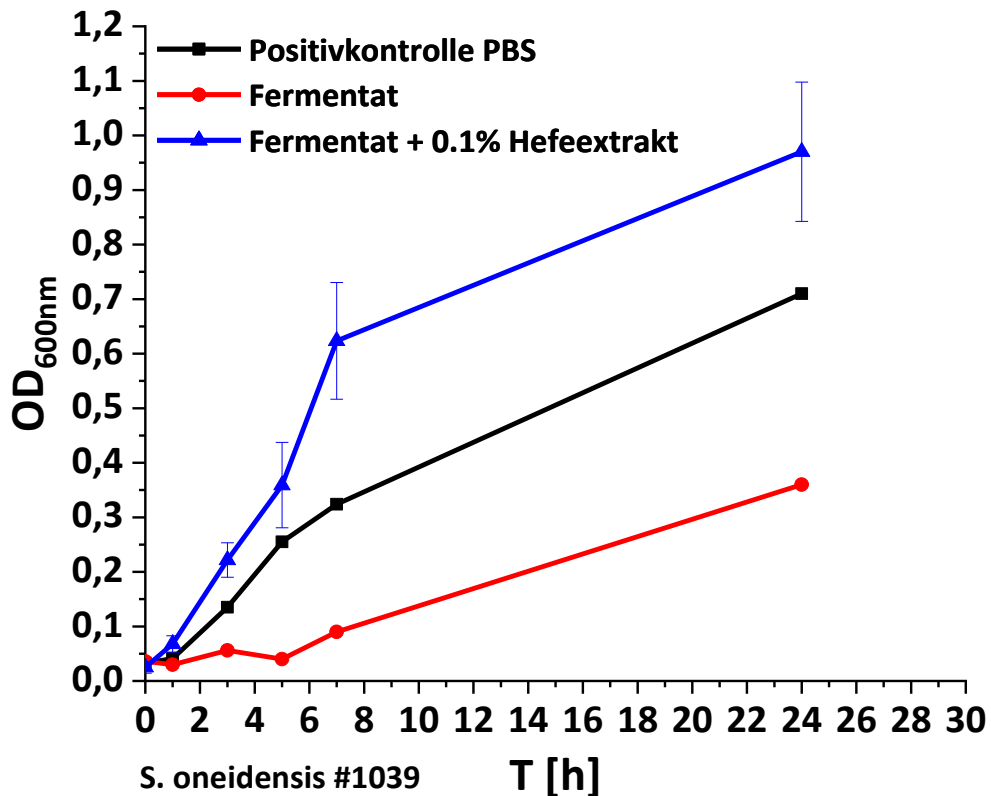


Abbildung 31: Wachstum von *Shewanella oneidensis* #1039 in PBS, Fermentat \pm 0,1% Hefe. *S. oneidensis* #1039 konnte in Fermentat mit Hefe (blau) besser wachsen, als in der Positivkontrolle mit PBS (schwarz). Die Versuche wurden bei 30°C in Kolben durchgeführt.

Die Produktion von Acetoin aus Propionat sollte durch den Einbau des Plasmids pBad_alsSD und die Induktion mit Arabinose ermöglicht werden.

In PBS konnte ein Abbau von 1,1 mM Propionat und eine Produktion von 0,21 mM Acetoin über 24 h gemessen werden. Dies entsprach einer theoretischen Ausbeute von knapp 37%. In diesem Versuch wurden in den Ansätzen mit Fermentat 0,01 mM Acetoin und mit der Zugabe von Hefeextrakt $0,4 \pm 0,09$ mM Acetoin produziert. Für beide Versuche konnte keine Bilanz aufgestellt werden, da die Konzentrationen an organischen Säuren über die HPLC-Messung nach 24 h angestiegen und nicht abnahmen.

3.4.2. Effizienzsteigerung der Produktion von Acetoin aus Propionat mit *Escherichia coli*

Nachdem der Nachweis über den Abbau der organischen Säuren zur Produktion der Plattformchemikalie Acetoin mit *S. oneidensis* fehlgeschlagen war, wurde nach einem geeigneten Organismus gesucht, der Propionat verwenden kann. In einer vorangegangenen Studie wurde bereits gezeigt, dass aerob Propionat von *E. coli* K12 verwendet wird. Zusätzlich dazu wurde eine Δrnr Mutante von Francesca Simonte erstellt, deren Wachstum, insbesondere unter anaeroben Bedingungen mit Nitrat als Elektronenakzeptor, gesteigert werden konnte (Simonte *et al.*, 2017).

Zunächst wurde das Wachstum eines Wildtyp K12-Stamms in M9 Medium mit Propionat und Butyrat überprüft. Falls die Abreinigung im vorangegangenen Schritt mit *G. sulfurreducens* im BES durchgeführt wurde, ist Propionat und Butyrat im Fermentat vorhanden. Daher wurden beide Säuren in M9-Medium verwendet.

Anschließend wurde eine Adaptionkampagne gestartet, indem Zellen jeweils nach drei Tagen von der laufenden Kultur in neues Medium (1:10) überführt wurden. Die Verbesserungen der Wachstumsrate und der Verdopplungszeit über die Adaptionsgenerationen ist in Abb. 32 zu sehen. Dadurch konnte eine Steigerung des Wachstums über die Adaption festgestellt werden. Nach der 6. Überführung war ohne Anlaufphase von Beginn an Wachstum zu detektieren, während die Anfangskultur kein Wachstum zeigte. Der adaptierte Stamm zeigte eine Verdopplungszeit von 7,7 h und eine Wachstumsrate von $\mu=0,1$.

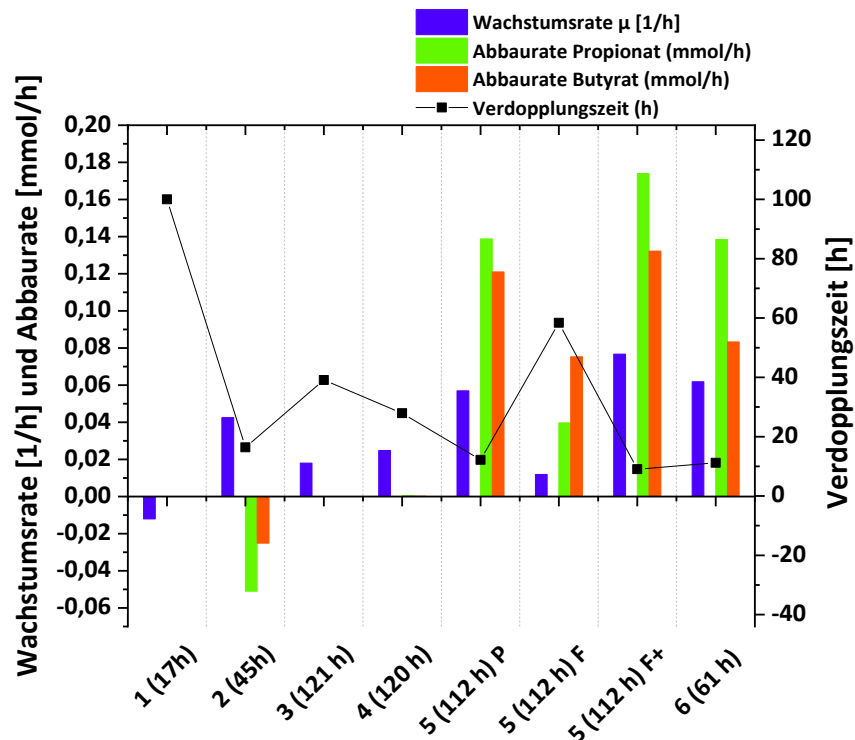


Abbildung 32: Wachstum, Verdopplungszeit und Abbauraten der Adaptionsexperimente von *E. coli* K12 an M9-Medium mit Butyrat und Propionat. Es werden die einzelnen Adaptionsgenerationen und in Klammer deren Laufzeiten der Analytik gezeigt. Die in blau abgebildeten Wachstums- und Abbauraten (Propionat grün und Butyrat orange) beziehen sich auf die linke Achse und sind als Balken dargestellt. Die sich auf die rechte Achse beziehende Verdopplungszeit ist als Liniendiagramm gezeigt. Neben M9 Medium wurde parallel zur 5. Überführung auch Fermentat mit und ohne Hefeextrakt getestet.

Die Entwicklung der Adaptionsgenerationen ist in Abb 32 gezeigt. Hier wurde wie beschrieben die Wachstumsrate, die Abbauraten für Propionat und Butyrat und die Verdopplungszeiten dargestellt. Nachdem in der ersten Generation keine Abnahme und kein Wachstum des *E. coli* K12 über 17 h zu sehen war, wurde die Kultivierungszeit verlängert. Bis auf die dritte Generation zeigte sich eine Verringerung der Verdopplungszeit, sodass parallel zur 5. Überführung in M9 Medium das Wachstum des Stamms in Fermentat mit und ohne Hefeextrakt untersucht wurde. Die Abbauraten von Propionat und Butyrat verhielten sich in der 5. und 6. Adaptionsgeneration ähnlich. Das in der 5. Generation getestete Fermentat mit Hefeextrakt führte zu einem vergleichbaren Wachstum. Nur in Fermentat war das Wachstum geringer, die Verdopplungszeit lag bei knapp 60 h und die Abbauraten der organischen Säuren fiel mit 0,04 mmol/h für Propionat und 0,08 mmol/h für Butyrat langsamer aus, als im M9 Medium. Im Medium konnte Propionat mit 0,12 mmol/h und Butyrat mit 0,16 mmol/h mindestens doppelt so schnell abgebaut werden.

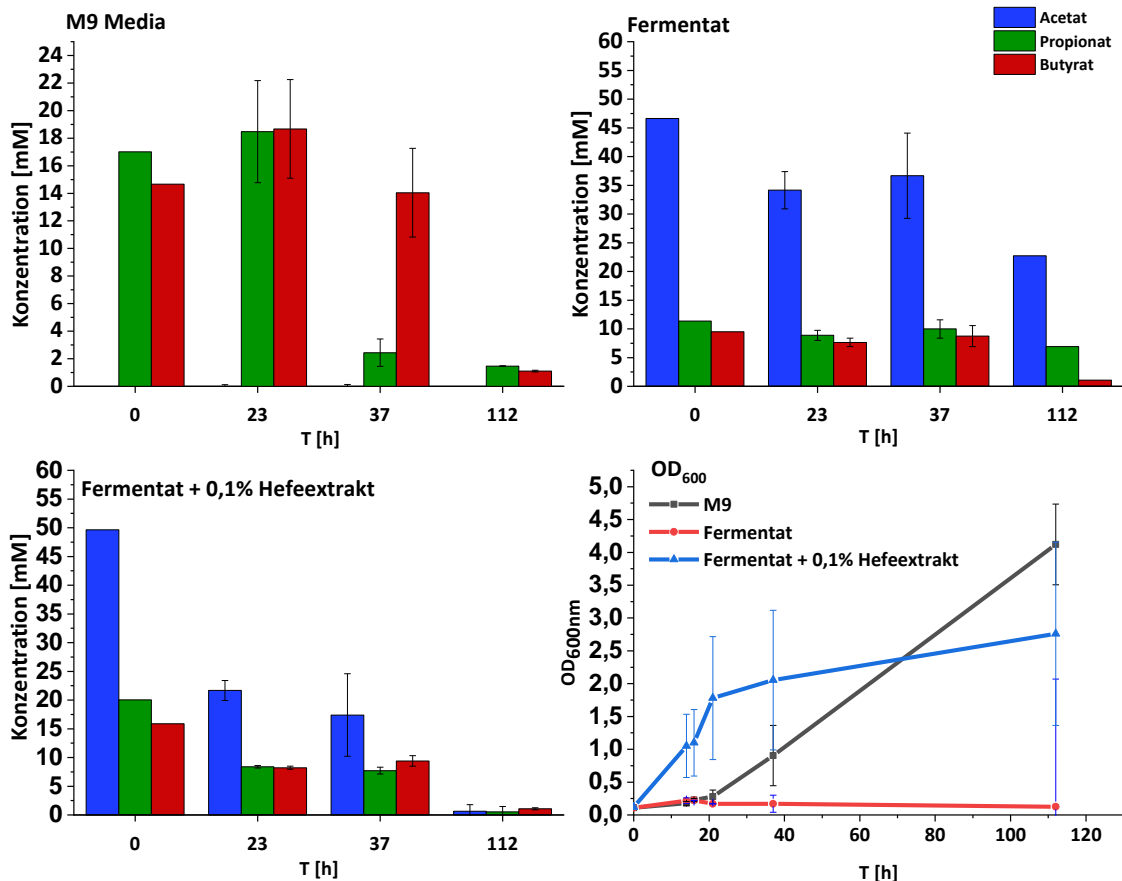


Abbildung 33: Wachstumskurven und Abbau der organischen Säuren in der 5. Adaptionsgeneration des *E. coli* K12 in M9-Medium, Fermentat und Fermentat mit 0,1% Hefeextrakt. Die Konzentrationen der organischen Säuren Acetat (schwarz), Propionat (rot) und Butyrat (blau) über vier Zeitpunkte. Die Wachstumskurven der drei Kultivierungslösungen werden als Liniendiagramm bei OD_{600nm} dargestellt.

Der Abbau der einzelnen Säuren und das Wachstum der 5. Generation in M9-Medium, Fermentat und Fermentat mit 0,1% Hefeextrakt wurde in Abb. 33 genauer beleuchtet. Das M9-Medium enthielt im Gegensatz zu den Fermentationsansätzen kein Acetat. Im Medium ist zu beobachten, dass bis zu Stunde 37 zunächst das Propionat abgebaut wurde, bevor bis zum Ende dieses Laufs (112 h) beide Säuren bis auf ca. 1 mM abgebaut wurden. Der Abbau der organischen Säuren und das Wachstum in Medium und Fermentat mit Hefeextrakt verliefen ähnlich. In Fermentat wurden zeitgleich auch Acetat und Butyrat abgebaut. Obwohl *E. coli* in Fermentat kein Wachstum zeigte, wurden die organischen Säuren über den Zeitraum von 112 h verwendet, jedoch nicht vollständig abgebaut. Die Acetatkonzentration wurde in dieser Zeit etwa halbiert.

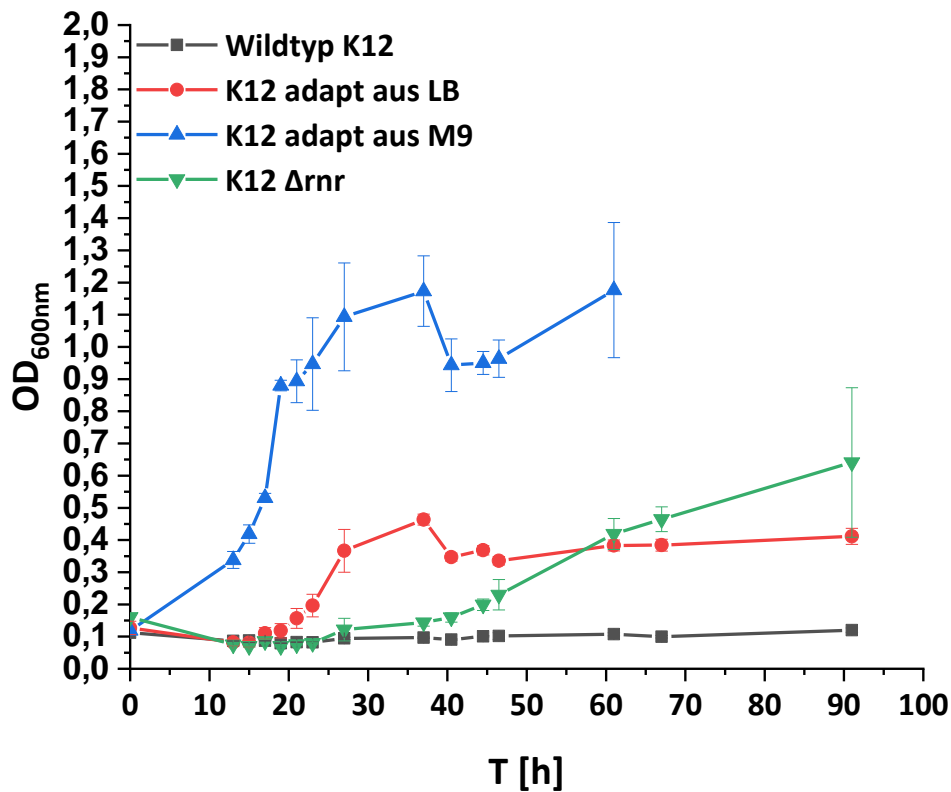


Abbildung 34: *Escherichia coli* K12 wurde in M9-Medium mit Propionat adaptiert. Das Wachstum des K12-Stamms wurde frisch in M9-Medium gegen das Wachstum eines an Propionat adaptierten K12-Stamms gezeigt. Der adaptierte Stamm wurde zur Adaption nach jeweils drei Tagen in frisches M9-Medium überführt. Hier ist das Wachstum des adaptierten Stamms nach der 6. Überführung gezeigt (blau). Der adaptierte Stamm wurde zudem in LB vorkultiviert (rot). Der K12 Δnrn Stamm (grün) wurde ebenfalls in LB vorinkubiert. Alle Wachstumskurven wurden bei OD_{600nm} 0,1 gestartet.

Daneben sollte untersucht werden, ob die Adaption auf Veränderungen des Transkriptoms zurück zu führen sind oder zu einer Mutation und einer dauerhaften Verbesserung des Wachstums mit Propionat geführt hat. Dazu wurde neben dem K12 Wildtyp die Vorkultivierung des adaptierten K12 Stamms einmal in LB (K12 LB) und einem in M9-Medium (K12 M9) durchgeführt und der bereits erwähnte K12 Δnrn -Stamm in M9-Medium getestet (Abb. 34). Durch die Vorkultivierung in LB zeigte K12 LB eine fast verdoppelte Wachstumsphase mit einem maximalen μ von 0,03 und einer Verdopplungszeit von 19,8 h. Der zuvor nicht adaptierte K12 Δnrn zeigte eine maximale Wachstumsrate μ von 0,02 bei einer Verdopplungszeit von 45 Stunden. Nach einer anfänglichen lag-Phase von ca. 35 h begann das Wachstum und zeigte am Ende des Versuchs (90 h) eine höhere OD, als K12 LB.

Während des Versuchs wurden zudem die Abbauraten von Propionat und Butyrat bestimmt. Der Wildtyp konnte weder Butyrat noch Propionat abbauen. Ähnlich der Wachstumskurve begann der Abbau der organischen Säuren mit K12 LB erst nach 24 Stunden. Propionat wurde mit 0,13 mmol/h und Butyrat mit 0,02 mmol/h abgebaut. Parallel dazu begann der Abbau der Fettsäuren mit K12 Δrnr nach 37 h und ergab über die gesamte Wachstumszeit eine Abbaurrate von 0,06 mmol/h für Propionat und 0 mmol/h für Butyrat. Wenn nur die Phase ab Tag 37 ausgewertet wird, konnte eine Abbaurrate für Propionat von 0,1 mmol/h erreicht werden. Der Abbau von Propionat begann mit K12 M9 sofort, wodurch ein Abbau von 0,22 mmol/h erreicht wurde. Butyrat wurde mit 0,1 mmol/h etwa halb so schnell abgebaut. Passend zur Wachstumskurve waren hier jedoch beide Säuren nach 37 h vollständig abgebaut. Dadurch konnte gezeigt werden, dass sich der Wildtyp K12 an die Kohlenstoffquelle adaptieren lässt und das Wachstum und der Abbau der organischen Säuren dadurch möglich wurden. Der Deletionsstamm K12 Δrnr zeigte jedoch auch ohne Adaption bereits eine ähnliche Effizienz des Abbaus und des Wachstums wie K12 LB.

E. coli K12 Δrnr als Produktionsstamm für Acetoin

Die Verwendung der organischen Säuren mit dem Wildtyp K12 konnte durch Adaption gesteigert werden. Der *E. coli* K12 Δrnr zeigte jedoch, wie in Abb. 34 zu sehen, bereits ohne Adaption eine bessere Effizienz als der Wildtyp. Daher wurde dieser verwendet, um die Produktion der Plattformchemikalie Acetoin aus den im Fermentat beinhalteten organischen Säuren zu untersuchen.

Um Acetoin mittels *E. coli* zu produzieren wurde in den Wildtyp K12 und den Δrnr Stamm das zuvor hergestellte Plasmid pMAL_alsSD eingebracht. Dieses Plasmid wurde von Förster *et al.* etabliert (Förster *et al.*, 2017). In Abb. 35 sind die Wachstumskurven der zwei Stämme in M9 Medium gezeigt. Hier wurde ein M9 Medium mit jeweils 10 mM Butyrat und Propionat verwendet.

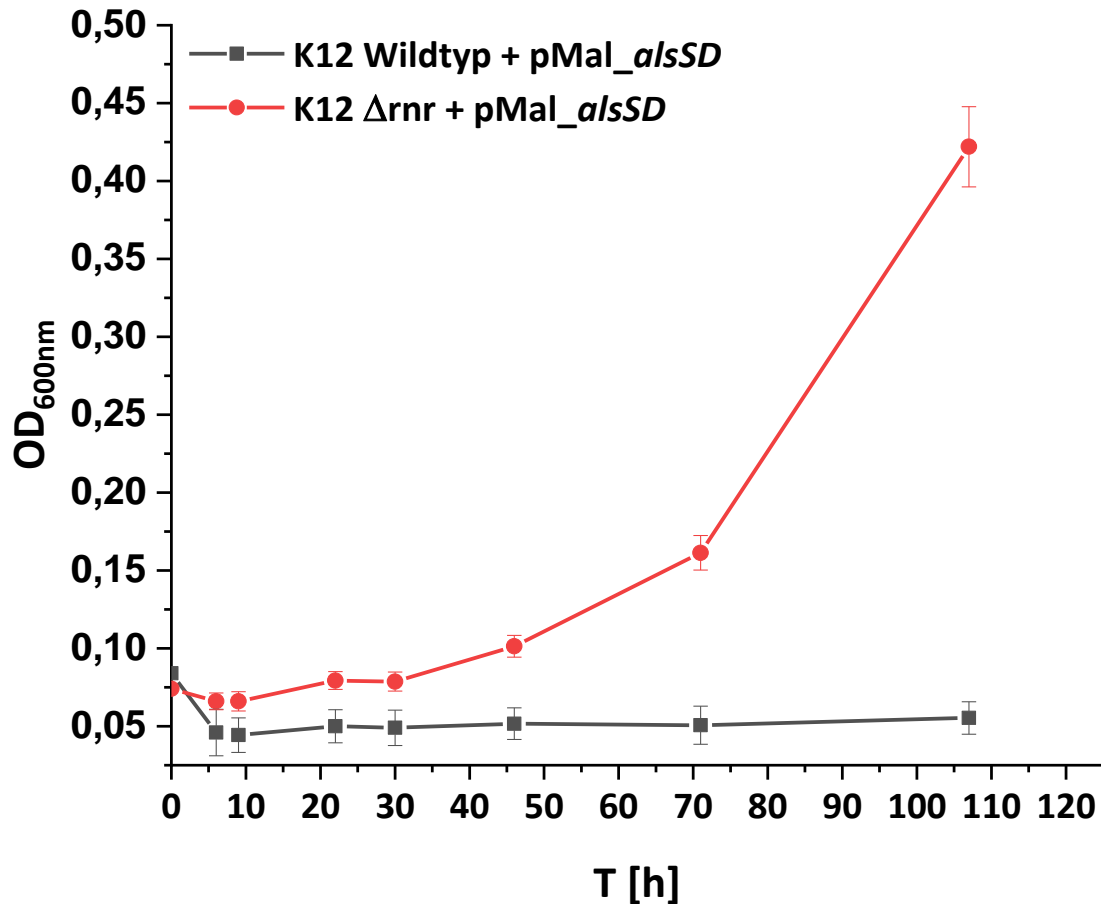


Abbildung 35: Optische Dichte des *E. coli* K12 Wildtyp und Δ rrn jeweils mit pMal_alsSD in Abhängigkeit der Versuchslaufzeit. Auf dem Plasmid sind die für die Acetoinproduktion benötigten Gene.

Parallel zum Wachstumsversuch der zwei Stämme wurden diese in einem Zellsuspensionsassay getestet. Dazu wurden die Versuche mit OD_{600nm} 10 gestartet.

Sowohl für die Wachstumsversuche als auch für den Zellsuspensionsassay wurde die Ausbeute der Acetoinproduktion ermittelt. Während des Wachstumsversuchs konnte mit der Δ rrn Deletionsmutante 0,7 mM Acetoin und mit dem adaptierten K12 0,25 mM Acetoin hergestellt werden. Im Zellsuspensionsassay konnten nach 6 Stunden 4,2 mM Acetoin (Δ rrn) und 3,1 mM Acetoin (adaptierter K12) produziert werden. Dies entsprach einem theoretischen Maximum für Δ rrn von 84% und für den adaptierten Wildtyp-Stamm von 62%. Diese Rechnung wurde erstellt mit der Annahme, dass die Konzentration des HPLC-Peaks von Propionat und Acetoin voneinander abgezogen werden können. Die Konzentration von Acetoin wurde über den Acetoin-Nachweis (Voges-Proskauer) gemessen und im Anschluss von der über die HPLC gemessenen Konzentration an Propionat abgezogen, da beide Substanzen einen gemeinsamen Peak bilden.

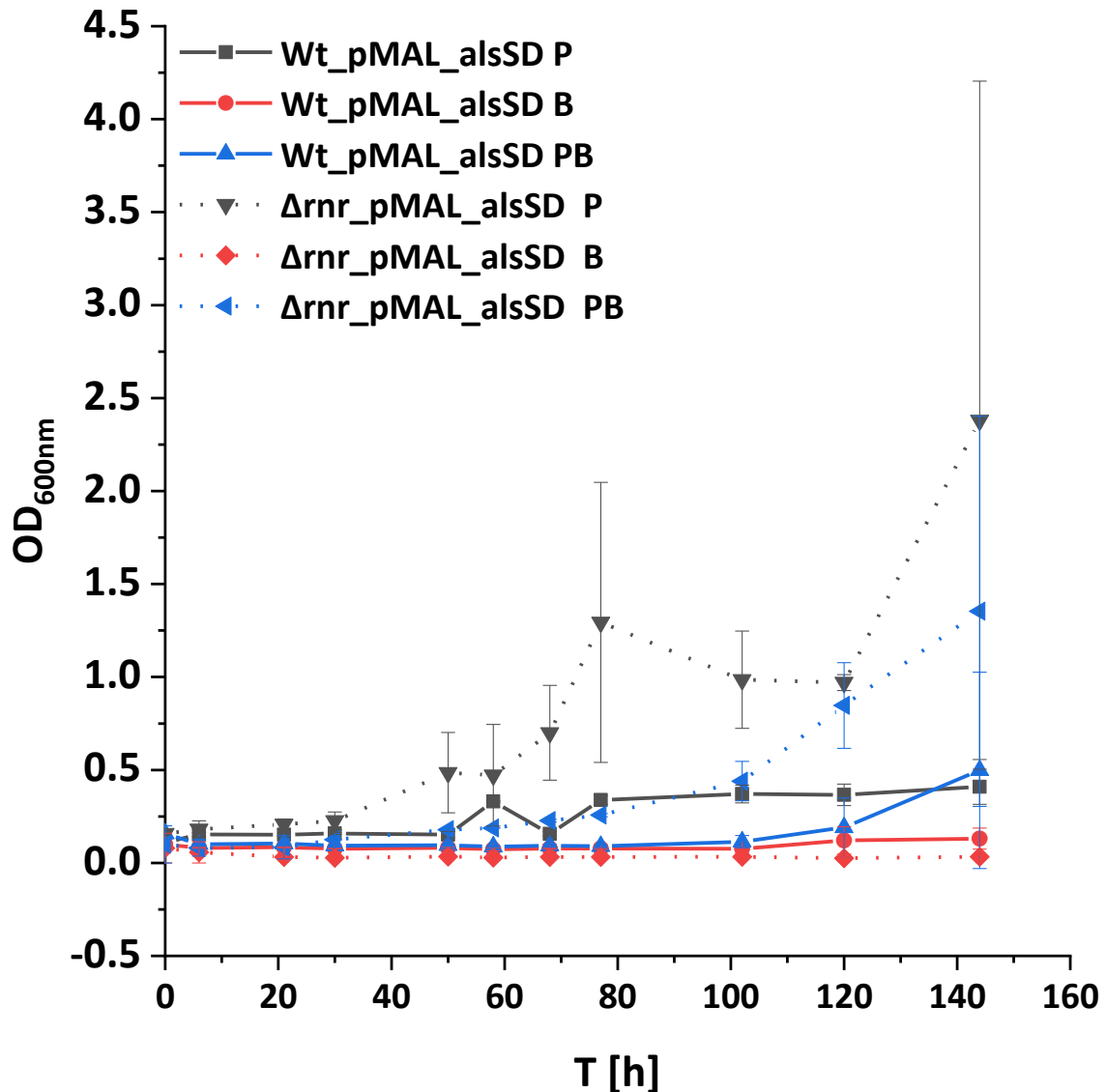


Abbildung 36: Optische Dichte während der Wachstumsversuche von K12 Wildtyp_pMal_alsSD (durchgehende Linie) und K12 Δrrn_pMal_alsSD (gepunktete Linie) in M9 Medium. Als Substrat wurde Propionat (schwarz), Butyrat (rot) oder beiden Säuren (blau) eingesetzt.

Das Wachstum der Stämme K12 Wildtyp_pMAL_alsSD und K12 Δrrn_pMal_alsSD wurde in M9 Medium mit Propionat, Butyrat sowie mit beiden organischen Säuren untersucht (Abb. 36). Beide Stämme zeigten mit Butyrat kein Wachstum. Die Wachstumsrate lag für den Wildtyp bei $\mu=0,009$ mit Propionat sowie mit Propionat und Butyrat bei $\mu=0,008$. Die Verdoppelungszeit lag dadurch bei etwa 76 bzw. 86 Stunden. Mit Δrrn wurde in beiden Ansätzen mit Propionat die gleiche Wachstumsrate von $\mu=0,019$ erreicht. Hier lag die Verdopplungszeit bei 37 bzw. 38 Stunden. Ein parallel getesteter K12 Wildtyp ohne Plasmid (nicht gezeigt) zeigte, wie zuvor, kein Wachstum mit Propionat und Butyrat über 144 h. Im

Gegensatz zu den Stämmen mit Plasmid konnte im WT die Abnahme von Propionat und Butyrat gemessen werden. Nach 144 h wurde der Abbau von ca. 9 mM Propionat und 2 mM Butyrat detektiert. Die Messungen der organischen Säuren in K12 Δrnr + pMal_alsSD und K12 WT + pMal_alsSD schwankte, daher konnte hier kein eindeutiger Abbau beschrieben werden. Dieser Versuch wurde ebenfalls als Zellsuspensionsassay über 24 Stunden durchgeführt. In allen Ansätzen konnte keine Abnahme der organischen Säuren beobachtet werden. Die Acetoinkonzentration nach 24 Stunden lag mit allen organischen Säuren mit Δrnr bei 0,5 mM. Im Gegensatz zum Wachstum wurde hier kein Unterschied festgestellt. Die Acetoinproduktion mit K12 lag mit Propionat bei 0,4 mM, mit Butyrat bei 0,1 mM und mit Propionat und Butyrat bei 0,16 mM.

Um zu testen, ob die Stämme die im Fermentat beinhalteten organischen Säuren verwenden können, wurde Fermentat aus dem OCP-Versuch eingesetzt. Dazu wurden die Stämme K12 Wildtyp_pMal_alsSD und Δrnr _pMal_alsSD in jeweils 1-2 Litern M9 Medium vorkultiviert. Als Kohlenstoffquelle wurden jeweils 10 mM Propionat und Butyrat dazugegeben. Der Zellsuspensionsassay wurde mit beiden Stämmen und einem Wildtyp ohne Plasmid zweimal durchgeführt. Dabei wurde vom Wildtyp_pMal_alsSD und dem Wildtyp K12 Propionat mit 0,29 bzw. 0,24 mmol/h abgebaut. Butyrat wurde vom adaptierten Stamm mit 0,07 mmol/h und vom Wildtyp mit 0,02 mmol/h abgebaut. Der Δrnr _pMal_alsSD Stamm konnte Propionat mit 0,37 mmol/h schneller abbauen, Butyrat wurde jedoch nicht verwendet. Insgesamt wurden im Schnitt innerhalb von 25 Stunden etwa 6-7 mmol Propionat abgebaut. In allen Ansätzen konnte im Anschluss über eine GC-Messung auch der Acetoingehalt bestimmt werden. Hierbei zeigten die beiden Stämme mit Plasmid sowohl in der Positivkontrolle, als auch im Fermentat eine Konzentration von ca. 1 mM Acetoin. Damit ergab sich für K12 adaptiert_pMal_alsSD eine Acetoinausbeute aus Propionat von 28% und für K12 Δrnr _pMal_alsSD von 21%. Inwieweit Butyrat zur Acetoinproduktion verwendet wurde, wurde nicht untersucht. K12 Wildtyp zeigte nur einen Abbau von 2 mM Butyrat über 25 Stunden.

4. Diskussion

Neben der Suche nach erneuerbaren Ressourcen und dem Recycling von Wertstoffen ist auch die Nutzung von Rest- und Abfallströmen ein aktueller Aspekt, der u.a. in bundesweiten Programmen festgehalten und gefördert wird. Den Abfallstoff stellen in dieser Arbeit Celluloseabfälle dar, wobei die beinhaltete Cellulose als Substrat für Bakterien dient. Für das Jahr 2016 waren ca. 1,4 Mt Hygienepapier als Abfall angefallen, dessen Energie- und Kohlenstoffgehalt bislang weitgehend ungenutzt ist. Als Modellabfall wurden Papierhandtücher gewählt, aus denen alternativ zur Verbrennung Strom und eine Plattformchemikalie generiert wurden.

4.1. Fermentation

4.1.1. Einfluss des pH-Werts

Für biotechnologische Anwendungen stellen die mikrobielle Zusammensetzung eines Umweltkonsortiums und das durch sie aus der Cellulose produzierte Produktspektrum eine Unbekannte dar. Daher wurde in dieser Arbeit gezielt ein Konsortium etabliert werden, welches zum einen adaptiert an die Biomasse stabil und durchsetzungsfähig ist und zum anderen ein durch geeignete Wahl von Prozessbedingungen, wie pH-Wert und Gasphase modifizierbares Produktspektrum zeigt. Als Inokulum wurden verschiedene Abwasserproben eingesetzt. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob das Produktspektrum über veränderte Bedingungen in Richtung löslicher Kohlenstoffverbindungen, wie organischer Säuren, beeinflusst werden kann.

In der ersten Fermentation wurden die Produktspektren von Holzpellets bzw. Toilettenpapier als Ausgangssubstrat getestet. Diese wurden verwendet, da im Vorfeld mit Holzpellets keine Methanbildung festgestellt werden konnte. Holzpellets bestehen im ökologisch besten Fall aus regionalen Restspänen, die nicht anderweitig genutzt werden können. Das erschwert jedoch die Benennung der genauen Zusammensetzung an Gehölzarten und Korngrößen des Sägemehls. Hinzu kommt, dass je nach Frische des Holzes Presshilfen und Trocknungsmittel zugesetzt werden dürfen (Schlussbericht 2001, Herstellung von Holzpellets, Bundesamt für Energie Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft). Je nach Norm sind natürliche Zusätze, wie Maisstärke, Roggenmehl oder Glycerin bis zu 2% w/w erlaubt (DIN 51731 oder ÖNorm M

7135). Daher ist hier nicht nachvollziehbar, welchen biologisch hemmenden oder verwendbaren Stoffen die Mikroorganismen in den Fermentationsansätzen ausgesetzt waren. Im Gegensatz zu Papier wurde hier eine gröbere bzw. stabilere Biomasse verwendet, die dadurch in Relation weniger Oberfläche zum Abbau bot und weniger Cellulose-Anteile besitzt als Papier (Kamide *and* Saito, 1987; Kamide, 2005; Klash *et al.*, 2010). Durch die Vorbehandlung des Toilettenpapiers werden Holzbestandteile, wie beispielsweise Lignin, entfernt und dadurch liegen hauptsächlich bereits verkürzte Cellulosepolymere vor. Zusätzlich wurde das Papier so behandelt, dass es saugfähig ist und in Wasser zerfällt. Die Cellulosefasern im Toilettenpapier liegen daher bioverfügbarer vor, als die Cellulose der Holzfasern.

Zu Beginn konnte in den Ansätzen mit Holzpellets bereits eine geringe Konzentration an Acetat gemessen werden. Ob diese bereits durch den Herstellungsprozess der Pellets beinhaltet war oder die Messung durch eine andere Substanz überlagert wurde, konnte nicht geklärt werden. Da sich zwischen den unterschiedlichen pH-Werten kein Unterschied in der Verteilung der organischen Säuren zeigte, ist davon auszugehen, dass das eingesetzte Konsortium nicht in der Lage war, diese Biomasse über den Versuchszeitraum von 80 Tagen abzubauen. Durch die erste Fermentation konnte gezeigt werden, dass mit dem eingesetzten Konsortium mit Holzpellets unabhängig vom pH-Wert kaum organische Säuren produziert werden. Im Gegensatz zu den Ansätzen mit Holzpellets wurden mit Toilettenpapier organische Säuren produziert. Bei pH-Werten von $< \text{pH } 6$ soll es vermehrt zur Produktion von Butyrat kommen (Arslan *et al.*, 2016). In diesem ersten Aufbau konnte dieser Trend nicht bestätigt werden. Für $\text{pH } 6$ zeigten die Ergebnisse den in der Literatur beschriebenen Trend, bei $\text{pH } 5$ konnte dieser jedoch nicht bestätigt werden. Durch eine Fermentation bei $\text{pH } 6$ wurde bis zum Ende des Versuchs verhältnismäßig mehr Butyrat als Propionat und Acetat produziert. Bei $\text{pH } 5$ wurden von allen Fettsäuren weniger als 10 mM erreicht, wobei Acetat gegen Ende des Versuchs wieder abgebaut wurde. Da in diesen Versuchen regelmäßig der pH-Wert wieder auf den gewünschten Wert eingestellt werden musste, kann das die Produktion beeinflusst haben. Inwieweit hier auch die Gasphase verändert vorlag und dies einen Einfluss hatte, wurde nicht untersucht.

Da hier die Wiederfindung des Kohlenstoffs bei $\text{pH } 5$ mit 49% und die Gesamtmenge an gebildeten organischen Säuren in Relation zum gemessenen TOC niedrig ausfiel, wurde für die folgenden Versuche nicht mehr mit $\text{pH } 5$ gearbeitet. Interessanterweise war die Kohlenstoffbilanz bei $\text{pH } 6$ mit 99% löslichen Kohlenstoffen, gebunden in organischen Säuren,

am höchsten. Dahingegen war die Gesamtmenge an organischen Säuren bei pH 7 am höchsten. Bei pH 7 wurden 84% des löslichen Kohlenstoffs gebunden in den organischen Säuren gefunden.

Dabei ist zu beachten, dass bei jeder Probennahme ein nicht zu definierender Anteil der Biomasse entnommen wurde. Bei einem Gesamtansatz von 250 – 2000 ml und einem Probenvolumen von ca. 1,5 ml wurde dieser Anteil jedoch vernachlässigt. Die Biomasse am Ende des Versuchs zu trocknen misslang, da zum einen Masse durch die Filtration bereits Masse verloren ging und zum anderen nach drei Tagen bei 60°C noch Restfeuchte vorhanden war. Daher wurde der Kohlenstoffgehalt des Papiers errechnet und der in den organischen Säuren gebundene Kohlenstoffgehalt dazu ins Verhältnis gesetzt. Dadurch konnten Rückschlüsse gezogen werden bei welchem pH-Wert die Biomasse effizienter abgebaut und in organische Säuren umgewandelt werden konnte. Im beobachteten Zeitraum konnte bei pH 6 bzw. 7 Anteile organischer Säuren von 19% bzw. 33% bestimmt werden. Für eine mesophile Fermentation hängt der optimale pH-Wert stark von der eingesetzten Biomasse und der mikrobiellen Zusammensetzung ab. Daher kann je nach Prozess das Optimum im neutralen bis basischen Bereich (pH 6-10) liegen (Perot *et al.*, 1988; Ueno *et al.*, 2006; Ye *et al.*, 2007). Neuere Untersuchungen ergaben, dass die Methanbildung in einem relativ engen pH-Bereich von etwa 5,5 bis 8,5 stattfindet, wobei das Optimum für die meisten Methanogenen bei pH 7 - 8 liegen (Demirel *and* Scherer, 2008). Für einen einstufigen Prozess, bei dem der Abbau von Biomasse z.B. mit Biogasproduktion gekoppelt ist, bietet sich demnach ein pH von etwa 7 an. Wenn keine Methanogenese stattfindet, verändert sich der pH-Wert des Systems mit den entstehenden Stoffwechselprodukten, wie z.B. bei der Produktion von organischen Säuren in den sauren Bereich. Dies wurde auch hier beobachtet.

In einer Biogasanlage wird die Syntrophie fermentierender Bakterien und methanproduzierender Mikroorganismen genutzt. Dazu muss ein Gleichgewicht von Produkten zu Substraten vorliegen. Die in der Fermentation produzierten organischen Säuren, vor allem Acetat, und Wasserstoff und CO₂ dienen den Methanogenen als Substrat für die Methanproduktion. Der fermentierende Schritt kann durch einen hohen Wasserstoffpartialdruck (pH₂) gehemmt werden. Auch das Produktspektrum, wie z.B. die Propionatkonzentration kann dadurch beeinflusst werden. Der Einfluss des Wasserstoffpartialdrucks fällt jedoch sehr unterschiedlich aus, so kann in einer Fermentation ein hoher pH₂ zu höheren Propionatkonzentrationen führen, in anderen Studien hat dieser

keinen Einfluss (Dong *et al.*, 1994; Wiesmann *et al.*, 2007). Van Lingen *et al.* postulieren, dass der thermodynamische Einfluss des pH_2 auf die Produktion organischer Säuren und weiterhin auf die Ausbeute von Wasserstoff und Methan nicht ohne die NADH-Oxidation betrachtet werden darf. Wenn das Verhältnis von NAD^+ zu NADH niedrig ist, müssen mehr reduzierte Stoffwechselprodukte hergestellt werden, um NADH zu oxidieren. Die Herstellung von Butyrat und Propionat aus Glucose ($Glucose + 2 H_2O \rightarrow Butyrat^- + 2 HCO_3^- + 2 H_2 + 3 H^+$ bzw. $Glucose + H_2O \rightarrow Acetat^- + Propionat^- + HCO_3^- + H_2 + 3H^+$) oxidieren beide das gesamte aus der Glykolyse erhaltene NADH zurück zu NAD^+ . Dadurch kann jedoch nicht erklärt werden, warum durch einen erhöhten pH_2 mehr Propionat, aber nicht mehr Butyrat produziert wird. Ein Unterschied zwischen diesen Wegen ist die H_2 -Ausbeute von 2 (Butyrat) bzw. 1 (Propionat) Äquivalent(en) pro einem Äquivalent Glukose. Je mehr H_2 vorliegt, desto mehr wird die NADH-Oxidation gehemmt ($NAD^+ + H_2 \rightarrow NADH + H^+$). Dies erklärt, dass dadurch der Stoffwechselweg gewählt wird, bei dem weniger H_2 zusätzlich entsteht. Zusätzlich ergibt die Produktion von Butyrat nur $1 \text{ mol}_{Butyrat}/\text{mol}_{Glukose}$, während die Produktion von Acetat und Propionat $2 \text{ mol}_{VFA}/\text{mol}_{Glukose}$ ergeben. Da durch die Produktion von Acetat und Butyrat mehr Säuremoleküle entstehen, wird der pH-Wert deutlicher beeinflusst (Zhang *et al.*, 2013; van Lingen *et al.*, 2016). Unter sauren Bedingungen wird zudem NAD^+ anstelle von NADH begünstigt (Schauenstein *et al.*, 1980). Eine saure Umgebung und eine erhöhte Konzentration an organischen Säuren, wie Propionat, hemmen wiederum die Methanogenese. Um den Prozess der Methanproduktion zu verringern und die Säureproduktion über Bedingungen, wie pH-Wert und Temperatur zu steigern, bleibt wenig Spielraum. Wie schon beschrieben laufen beide Prozesse am effektivsten in neutralem Bereich ab. Der Schritt der Methanogenese ist der limitierende Schritt in der Methanproduktion aus Biomassen. Trotzdem kann, wie in den hier durchgeführten Fermentationen von mehr als 40 Tagen, eine eindeutige Zunahme der Zellzahl erfolgen. Die Verdopplungszeit einiger prominenter methanogener Organismen, wie *Methanomethylovorans thermophile*, *Methanosarcina horonobensis* oder *Methanobacterium subterraneum* liegt zwischen 4 bis 14 Stunden. Das Temperaturoptimum liegt für Methanogene im mesophilen Bereich ($25-42^\circ\text{C}$), wobei einzelne Vertreter bereits ab 0°C bzw. bis 120°C wachsen können (Kurr *et al.*, 1991; Franzmann *et al.*, 1997). Daher ist keine Abtrennung über die Temperatur möglich. Beide Prozesse, Fermentation (Hydrolyse, Acidogenese und Acetogenese) und Methanogenese, laufen bei etwa 30°C und im neutralen pH-Bereich ab.

Durch die Überführung der Fermentation in 1-Liter Ansätze fiel das Produktspektrum der Fermentationen bei pH 6 und pH 7 verändert aus. Zum einen wurden die organischen Säuren bis zur Beendigung des Versuchs nicht wieder ganz abgebaut, zum anderen wurden unter pH 6 am meisten Propionat produziert, wobei nahezu die gleichen Konzentrationen an Acetat und Butyrat gemessen wurden. Durch die Fermentation bei pH 7 wurden zu gleichen Teilen Acetat und Propionat produziert, wobei Butyrat hier nicht detektiert wurde. Diese Ergebnisse passen wiederum zu dem von Arslan *et al.* beschriebenen Phänomen, dass bei $< \text{pH } 6$ mehr Butyrat produziert wird (Arslan *et al.*, 2016). Ob die Veränderung des Substrats von Toilettenpapier zu Handtuchpapier eine Rolle spielt, kann nicht festgestellt werden.

Durch die Verdopplung des Fermentationsansatzes auf 2 Litern war eine Angleichung des Produktspektrums beider pH-Werte zu sehen. In beiden Ansätzen wurde mit Abstand am meisten Acetat produziert, während bei pH 6 die Konzentrationen an Butyrat und Propionat weniger als 10 mM betragen. Daneben wurde weiterhin der Effekt beobachtet, dass ein höherer pH-Wert zu höheren Konzentrationen an organischen Säuren führte. Wie schon in den ersten Fermentationsansätzen wurde bei pH 7 die doppelte Konzentration organischer Säuren im Vergleich zu pH 6 produziert. Kohlenhydratreiche Substraten, wie Papier, werden vor allem zu organischen Säuren fermentiert. Durch lange Verweilzeiten und einen neutralen pH-Wert kann die Produktion organischer Säuren erhöht werden. Propionat wird jedoch vor allem aus proteinreichen Substraten hergestellt. (Arslan *et al.*, 2017).

Durch die Fermentation unter Stickstoffatmosphäre konnte in allen Ansätzen eine höhere Produktion an organischen Säuren im neutralen Bereich gemessen werden. Bei pH 7 wurde die doppelte Menge Kohlenstoff gebunden in den organischen Säuren im Gegensatz zu pH 6 produziert. Die Verteilung der untersuchten Produkte Acetat, Butyrat und Propionat hat sich bei pH 6 dem von pH 7 angeglichen. Zu Beginn und im 1-Liter Ansatz wurde hier im Vergleich am wenigsten Acetat und zunächst am meisten Butyrat, später mehr Propionat produziert.

4.1.2. Einfluss der Gasphasen N_2 und H_2/CO_2

Miller und Wolin untersuchten, auf welchen Wegen Acetat, Propionat und Butyrat gebildet werden. Dabei konnten sie nur wenige Unterschiede zwischen einer Celluloseabfallmasse und Glucose als Kohlenstoffquelle feststellen. Acetat wurde dabei mit bis zu einem Drittel mit CO_2 über den Wood-Ljungdahl-Weg gebildet. Propionat wurde über einen CO_2 -Fixierungsweg gebildet und Butyrat über die Acetyl-CoA Coenzym A Kondensation (Miller *and* Wolin, 1996).

Für die Butyratproduktion ist bislang kein CO₂-Fixierungsschritt bekannt. In Abb. 23 sind der Wood-Ljungdhal-Weg als Syntheseweg der Acetatproduktion und die HCO₃⁻ verbrauchenden Wege über 3-Hydroxypropionat/ 4-Hydroxybutyrat (3 HP/4 HB) sowie der 3-Hydroxypropionatbizyklus dargestellt. Letzterer verwendet das über Succinyl-CoA entstandene Glyoxylat, um wieder Acetyl-CoA zu generieren.

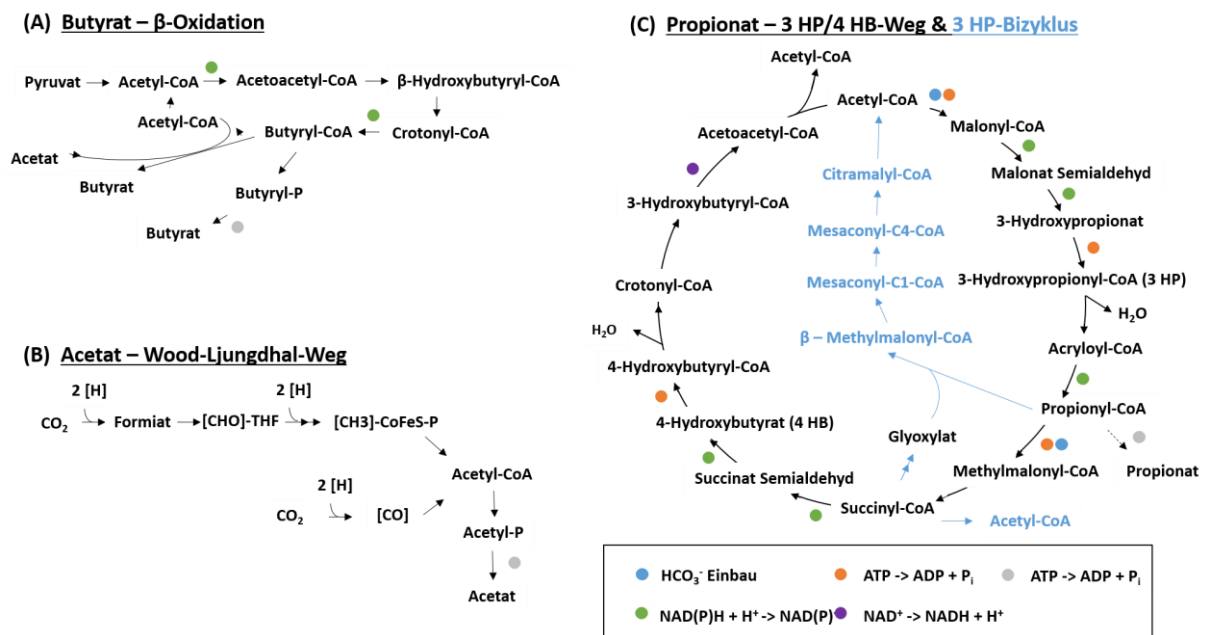


Abbildung 37: Vereinfachte Darstellung von VFA-Produktionswegen einer Glucose- oder Cellulosefermentation. (A) Butyratproduktion über die β -Oxidation. **(B)** und **(C)** Produktionswege für Acetat (Wood-Ljungdhal-Weg) und Propionat (3HP/4HB-Weg oder 3HP-Bizyklus) in denen CO₂ bzw. HCO₃⁻ fixiert werden. Verändert nach (Miller *and* Wolin, 1996; Ragsdale *and* Pierce, 2008; Teufel *et al.*, 2009; Köpke *et al.*, 2013; Esquivel-Elizondo *et al.*, 2017).

Unter dieser Annahme wurde der Versuchsaufbau ebenfalls mit Glucose, dem Monomer der Cellulose, untersucht. Dabei wurde die Erstellung einer Kohlenstoffbilanz durch die Messbarkeit des Substrats ermöglicht und eine verkürzte Versuchsdauer durch die bessere Bioverfügbarkeit der Glucose erreicht. Unter Stickstoffatmosphäre zeigte sich die gleiche Verteilung, wie mit Cellulose. Auch hier entstand bei pH 6 – 8 die höchste Konzentration an Acetat, wobei die Konzentration mit steigendem pH-Wert zunahm. Unter Wasserstoffatmosphäre wurde im Gegensatz dazu mehr Butyrat, als Propionat produziert. Dabei stieg mit steigendem pH-Wert auch Ausbeute des Kohlenstoffs in den organischen Säuren aus Glucose. Von pH 5 - 8 konnten unter Stickstoffatmosphäre Ausbeuten von 19%, 44%, 45% und 83% gemessen werden. Unter Wasserstoff waren die Ausbeuten mit

aufsteigenden pH-Werten 43%, 68%, 67%, 62%. Damit konnte hier ab pH 6 keine Verbesserung der Kohlenstoffbilanz mit steigendem pH-Wert mehr festgestellt werden.

Das Konsortium aus den 2-Liter Ansätzen wurde als Inokulum für den Gasphasenversuch verwendet. Hier wurden die Ergebnisse aus den Glucoseversuchen mit Cellulose überprüft. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Versuchen wurde nicht nur unter Stickstoffatmosphäre, sondern auch unter H_2/CO_2 nur Acetat gebildet. Die Gasphase hatte auf die Verteilung der organischen Säuren demnach keinen Einfluss. Für pH 6 und 7 wurde jeweils unter Stickstoffgasphase die höchste Konzentration an Acetat gemessen. Wobei der höchste Wert bei pH 7 zu sehen war. Wiederum zeigte der pH-Wert einen größeren Einfluss auf das Fermentationsergebnis, als die Gasphase. Wenn jedoch ein pH-Wert betrachtet wird, kann die Ausbeute mit dem verwendeten Konsortium und Biomasse durch die Verwendung von Stickstoff im Gegensatz zu H_2/CO_2 gesteigert werden.

Laut Zhou *et al.* kann durch Verringerung des Wasserstoffpartialdrucks die Kohlenstoffbilanz aus Glucose zugunsten der organischen Säuren verschoben werden. Zusätzlich wird dadurch ein Anstieg an *Clostridium* sp. verzeichnet (Zhou *et al.*, 2017). Propionat kann laut Dong *et al.* nur von acetogenen Bakterien abgebaut werden, wenn der Wasserstoffpartialdruck niedrig ist (Dong *et al.*, 1994). Vorausgesetzt Propionat wurde zuvor produziert, sollte es daher unter H_2/CO_2 -Atmosphäre nicht mehr abgebaut werden bzw. unter Stickstoff der Abbau nicht gehemmt werden. Die Produktion von Propionat soll zusätzlich von einer H_2/CO_2 -Atmosphäre weder begünstigt, noch gehemmt werden (Kaspar *and* Wuhrmann, 1978; Inanc *et al.*, 1999). Im Fall der Fermentation mit Glucose wurde die höchste Konzentration von Propionat bei Stickstoff und pH 7 erreicht. Das lässt den Schluss zu, dass der Einfluss des pH-Werts eine größere Rolle spielen könnte, als die Gasphase. Durch die unbekanntes Zusammensetzung des Fermentationskonsortiums und des pH_2 , können die ablaufenden Stoffwechselwege und der daraus resultierende Einfluss der Produkte auf weitere Stoffwechselforgänge nicht eindeutig identifiziert werden. Die Konzentration der detektierten organischen Säuren hängt von deren Produktion und vom Abbau ab. Einerseits können die eingesetzten Bedingungen bereits die Organismen hemmen, die für den Abbau der Cellulose und/oder die Produktion der Säure verantwortlich sind. Andererseits kann dadurch der Abbau der Säuren zu H_2 , CO_2 und CH_4 gehemmt werden. Das bedeutet, dass Produkte und Substrate des einen Prozesses den anderen erst ermöglichen oder hemmen. Die geringere Konzentration an Acetat in den Ansätzen mit H_2/CO_2 kann auf eine Hemmung des Aufbaus oder des Abbaus durch

Methanogenese zurückzuführen sein. Ebenso kann durch die Hemmung der Acetogenese eine höhere Konzentration an Butyrat und Propionat entstehen, da dieses nicht weiter abgebaut wird. Ein hoher Gehalt an Propionat, Acetat und Wasserstoff kann ebenfalls die Nutzung von Propionat zur Methanproduktion hemmen (Fukuzaki *et al.*, 1990). Laut Schulmand und Valentino (1976) konnte unter Wasserstoffatmosphäre im Vergleich zur Stickstoffatmosphäre mehr Propionat und eine größerer Konzentration an organischen Säuren produziert werden (Schulmand *and* Valentino, 1976). Die Konzentrationen einer Säure kann jedoch auch den Auf- oder Abbau der anderen Säuren hemmen (Van Lier *et al.*, 1993). Neben der Substrathemmung, können organische Säuren, vor allem Propionat, auf Bakterien toxisch wirken. Dieser Effekt tritt ein, da die organischen Säuren bei Aufnahme in das Bakterium im Cytoplasma akkumulieren, deprotonierend wirken und dadurch den pH-Wert senken können (Yu *et al.*, 2010; Chun *et al.*, 2014). Einige Organismen können sich jedoch, oftmals einhergehend mit einem höheren Gehalt an intrazellulärem Phosphat, an organische Säuren adaptieren (Calhoun *and* Kwon, 2010).

Durch die Vergrößerung des Versuchsvolumens und die dadurch in Relation verkleinerte Gasphase wurde das Produktspektrum verändert. Zusätzlich wurde bei den Ansätzen mit einem und zwei Litern Papierhandtuch statt Toilettenpapier verwendet. Dieses hat durch seinen Anwendungszweck eine etwas andere Zusammensetzung. Im Gegensatz zu Toilettenpapier soll dieses erst verzögert bei Flüssigkeitsaufnahme zerfallen und quillt daher zunächst mehr auf. Die Bioverfügbarkeit dieser Biomasse wurde nicht untersucht, über die Unterschiede hinsichtlich Füll- und Hilfsstoffen ist nichts bekannt. Dadurch kann sich jedoch ein unterschiedlicher Verlauf zwischen den Fermentationen mit den Papieren erklären. Daneben spielt sicherlich ein Adaptationseffekt eine Rolle. Da die Fermentationen über mehr als 40 Tage jeweils untersucht wurden, konnten auch Mikroorganismen, deren Verdopplungszeit vergleichsweise länger dauert an Zellzahl gewinnen. Zum anderen sollte der Abbau der Biomasse schneller vonstattengehen und die Produktion der organischen Säuren eher einsetzen.

4.1.3. Mikrobielle Zusammensetzung

Zum vollständigen mikrobiellen Abbau einer Biomasse ist ein mehrstufiger Prozess nötig, der sich in Hydrolyse, Acidogenese, Acetogenese und acetoclastische bzw. hydrogenotrophe Methanogenese unterteilen lässt. In Biogasanlagen wird so nahezu die gesamte Biomasse in bis

zu 75% Methan und/oder 50% CO₂ umgesetzt, wobei ebenfalls H₂, H₂S und Stickstoffverbindungen entstehen können (Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe e. V.). Jedoch beeinflussen sich die Schritte gegenseitig. So können Stoffwechselprodukte die Produktion anderer hemmen, wobei die Zusammensetzung eines Konsortiums dabei eine große Rolle spielt. Neben dem Abbau kann chemolithotroph mit H₂ als Elektronendonator und CO₂ als Elektronenakzeptor wieder Acetat aufgebaut werden.

Für den ersten Schritt, der Hydrolyse der Biomasse in ihre Monomere, sind Bakterien verantwortlich, welche enzymatisch Cellulose spalten können. Laut der Datenbank ncbi werden 86887 Sequenzen für Cellulasen innerhalb der Bakterien gefunden (cellulase - Protein - NCBI, 2018). *Clostridium sp.*, *Proteus vulgaris*, *Peptococcus sp.*, *Bacteroides sp.*, *Bacillus sp.*, *Vibrio sp.*, *Acetovibrio cellulitica*, *Staphylococcus sp.* und *Micrococcus sp.* wurden bereits 1986 als cellulolytische MO beschrieben (Stronach *et al.*, 1986). Unter den Bacteroidales treten Gattungen wie *Dysgonomonas* oder *Bacteroides* auf, für die die Vergärung von Zuckern bzw. der Abbau von cellulosehaltigen Substraten zu den organischen Säuren Acetat, Propionat und Butyrat beschrieben sind (Hofstad *et al.*, 2000; Robert *et al.*, 2007). Unter den *Micrococcales* sind ebenfalls Cellulose abbauende Vertreter, wie *Cellulomonas*, zu finden (Han and Srinivasan, 1968).

Während der Fermentation von Holzpellets und Toilettenpapier wurden auch celluloseabbauende MO gefunden. In allen Ansätzen, außer mit Pellets bei pH 5, konnte als dominierende Ordnung die der Bacteroidales gefunden werden. *Bacteroides sp.* ist als obligat anaerobes Bakterium beschrieben, das u.a. Acetat produziert. *Bacteroides succinogens* kann Cellulose und Cellobiose verwerten (Groleau and Forsberg, 1981). In den Papieransätzen wurden Sequenzen gefunden, die über blastn mit 99% identisch zu *Bacteroides graminisolvens* sind. Dieses Bakterium ist in der Lage Glucose und Cellobiose zu Acetat, Propionat und Succinat abzubauen. Die optimalen Wachstumsbedingungen liegen bei 30-35°C und pH 7,2 (Nishiyama *et al.*, 2009).

Die hier in der ersten Sequenzierung als zweitgrößte Ordnung vorkommenden Clostridiales wurden nach dem Gasphasenversuch zur dominierenden Ordnung. Durch die Überführungen hat sich hier die mikrobielle Zusammensetzung geändert. Diese Ordnung zeichnet sowohl ein breites Substrat-, als auch Produktspektrum aus. Einige Vertreter sind in der Lage Cellulose abzubauen. Laut Zhou *et al.* setzt sich *Clostridium sp.* als dominierende Spezies durch, wenn kohlenstoffreiche Substrate eingesetzt werden und ein geringer Wasserstoffpartialdruck

vorhanden ist (Zhou *et al.*, 2017). Bei pH 6 wurden weniger Clostridiales gefunden, als bei pH 7. Unter H₂/CO₂ konnten bei pH 7 jedoch mit 99% mehr Sequenzen den Clostridiales zugeordnet werden, als unter N₂ mit 95%. Bei pH 6 waren diese mit 77% bei H₂/CO₂ etwas weniger häufig, als bei N₂ mit 80%. Der pH-Wert hatte auf diese Ordnung mehr Einfluss, als die Wahl der Gasphase.

Durch die Vergärung von Kohlenhydraten oder Pepton produzieren Vertreter der Clostridiales normalerweise ein Gemisch von Alkoholen und Säuren (oft Butyrat und Acetat), außerdem werden meist CO₂ und H₂ als Endprodukte freigesetzt. *Clostridium propionicum* produziert u.a. Propionat und *C. acetobutylicum* hauptsächlich Butyrat (Dürre, 2014). *Bacteroides cellulosolvens* und *Clostridium saccharolyticum* konnten in Kokultur 33% mehr Cellulose fermentieren (Murray, 1986). *Propionicimonas* als Vertreter der Propionibacteriales, die vor allem in der ersten Fermentation gefunden wurden, ist in der Lage Acetat und Propionat aus Glucose herzustellen (Akasaka *et al.*, 2003). In der Familie der Porphyromonadaceae sind ebenfalls Vertreter, die Cellobiose verwenden können. Unter anderem werden Acetat und Butyrat produziert (Sakamoto, 2014). Die vor allem in den Ansätzen mit Holzpellets detektierten Fusobacteriales konnten über blastn mit 99% Identität den *Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum* zugeordnet werden. Dieser ist laut Genomdaten in der Lage Butyrat-Fermentation durchzuführen (Karpathy *et al.*, 2007). Zuvor wurde bereits beschrieben, dass mit und ohne Glucose hauptsächlich Butyrat, aber auch Acetat und Propionat gebildet werden (Dzink *et al.*, 1990). Vor allem Vertreter der Lachnospiraceae, Ruminococcaceae und einiger Bacteroidetes sind in der Lage Butyrat zu produzieren (Vital *et al.*, 2017). Ein niedriger Wasserstoffpartialdruck, leicht saure Bedingungen bis pH 6,3 und lange Retentionszeiten sollen die Butyratproduktion begünstigen (Mitchell *et al.*, 2009).

Durch die Zusammensetzung dieser im Konsortium beinhalteten Gattungen sollten hauptsächlich organische Säuren produziert werden. Diese können im nächsten Schritt über acetogene Mikroorganismen weiter zu Acetat, Formiat und H₂ und CO₂ abgebaut werden. Bei Abwesenheit sollten die produzierten organischen Säuren über die Zeit akkumulieren. Da nach der ersten Fermentation keine Methanogenen gefunden wurde, passt dies zu den Fermentationsergebnissen, in denen Acetat als Hauptprodukt vorlag.

Durch die Adaption an die Biomasse wurde das Konsortium verändert, wodurch hauptsächlich Acetat produziert wurde. Hier konnten einige Sequenzen eindeutiger einer Familie oder sogar Art zugeordnet werden. Wie schon zuvor beschrieben hatten sich in allen Ansätzen

Clostridiales als dominierende Ordnung durchgesetzt. Obwohl vor allem die als Butyrat-Produzenten beschriebenen Familien Lachnospiraceae und Ruminococcaceae detektiert wurden, sind die weiterhin identifizierten Arten nicht als solche beschrieben. Hier konnte u.a. *Clostridium papyrosolvans* und *Clostridium hungatei* identifiziert werden, für die neben Ethanol- auch Acetatproduktion aus Cellulose und Glucose beschrieben sind (Madden *et al.*, 1982; Monserrate *et al.*, 2001). Daneben wurden bei pH 6 mit etwa 20% unter beiden Gasphasen Vertreter der Bifidobacteriales gefunden. Sowohl über die verwendete SILVA-Datenbank, als auch über eine blastn Zuordnung wurden die Sequenzen mit einer 100%-igen Identität *Bifidobacterium minimum* zugeordnet. Über diesen wurden bisher nur genomische Daten gesammelt, wobei u.a. Gene gefunden wurden, die für eine Acetatkinase kodieren. Daher sollte dieser Stamm Acetat produzieren können (Biavati *et al.*, 1982). Die Ordnungen der Micrococcales wurde hauptsächlich bei pH 7 unter N₂-Atmosphäre gefunden (Stackebrandt *et al.*, 1997). *Cellulosimicrobium sp.* können ebenfalls Cellobiose verwenden und produziert u.a. Acetat aus Glucose (Bakalidou *et al.*, 2002; Yoon *et al.*, 2007; Ahmed *et al.*, 2014).

Unter den Selemonadales wurde die Familie der Veillonellaceae detektiert, deren Vertreter teilweise Kohlenhydrate fermentieren, wobei organische Säuren aus 2-6 C-Atomen entstehen. *Sporomusa aerivorans* (nur in pH 7 unter H₂/CO₂-Gasphase) wurde u.a. über blastn zu 100% identifiziert. Dieses kann H₂/CO₂ verwenden und decarboxyliert Succinat zu Propionat (Boga *et al.*, 2003). Mit weniger als 10 Sequenzen pro Probe und damit < 0,1% wurden Vertreter der Propionibacteriales gefunden. Die Sequenzen wurden *Naumannella halotolerans* und *Propionibacterium acidipropionici* zugeordnet, die hier die nachweislich einzigen Propionatproduzenten darstellten (Filya *et al.*, 2004; Stackebrandt *et al.*, 2006; Rieser *et al.*, 2012; Piwowarek *et al.*, 2018). Jedoch konnten sich diese offensichtlich weder in den Sequenzierungsergebnissen durchsetzen noch zum Produktspektrum beitragen. Unter den dominierenden bereits beschriebenen primär gärenden Bakterien, wurden auch säureabbauende gefunden. *Comamonas nitrivorans* kann u.a. Acetat, Propionat und Butyrat unter Nitrat- oder Nitrit-Atmung abbauen (Etchebehere *et al.*, 2001). Für die Flüssigphase wurde parallel zur TOC-Messung der Stickstoffgehalt analysiert. Ein Anstieg an gasförmigen Stickstoff oder eine Veränderung des gelösten Stickstoffs wurde jedoch nicht beobachtet.

Der während des Abbaus von Butyrat und Propionat frei werdende Wasserstoff wirkt hemmend auf die abbauenden Organismen (Produkthemmung). Daher sind diese Abbauege

in der Regel nur in Verbindung mit Methanogenese möglich, durch die der entstandene Wasserstoff abgebaut wird. Durch die Oxidation von Propionat und Butyrat werden Elektronen frei, wodurch Wasserstoff gebildet wird (Tab. 5). Dieser wird wiederum von Methanogenen mit CO_2 zu CH_4 umgesetzt (Angelidaki *et al.*, 2011). Propionat kann zu Acetat und Butyrat abgebaut werden, wobei Butyrat im Anschluss zu Acetat oxidiert wird (De Bok *et al.*, 2001). Ansonsten wird Propionat zu Acetat oxidiert, wodurch CO_2 frei wird. Die beschriebenen Vertreter gehören der Ordnung der Syntrophobacterales, oder der Familie der *Peptococcaceae*, einer Ordnung der Clostridiales, an (Müller *et al.*, 2010). Diese wurden in keiner Sequenzierung gefunden. Daher ist davon auszugehen, dass im Laufe der Fermentationen eine Selektionierung stattgefunden hat. Dadurch konnten sich die am besten angepassten und am schnellsten wachsenden Bakterien durchsetzen. In diesem Fall waren das vor allem Vertreter der Clostridiales, die Acetat aus Cellulose oder Cellobiose produzieren. In den Gasphasenversuchen wurden kaum Propionibacterales, als Propionatproduzenten, oder Clostridiales, die über Acetat hinaus als Säureproduzenten beschrieben waren, gefunden. Daher passen diese Sequenzierungsergebnisse dazu, dass in diesen Ansätzen nur Acetat gebildet wurde. Da unter neutralen pH-Werten, wie schon beschrieben die Fermentationseffizienz höher ausfällt, als unter sauren Bedingungen, erklärt dies die höhere Acetatkonzentration bei pH 7. Ob die bei pH 7 unter H_2/CO_2 in höherem Anteil auftretenden Micrococcales von der Gasphase beeinflusst wurden, ist nicht beschrieben. Den größten Einfluss hatte hier wieder der pH-Wert, wie in den Fermentationen zuvor. Bei pH 6 konnten sich verhältnismäßig mehr Bifidobacterales durchsetzen. Welche Rolle diese, außer der für *Bifidobacterium minimales* beschriebenen, in der Fermentation einnehmen, konnte nicht geklärt werden. Ein den Pseudomonadales angehörende Vertreter, der mit 99% Identität *Pseudomonas pseudoalcaligenes* zugeordnet wurde, konnte hauptsächlich bei pH 6 nachgewiesen werden. Interessanterweise kann dieses Acetat verwenden und ist als Bakterium beschrieben, dass über eine Cyanase Cyanide (R-C-N) in CO_2 und Ammonium abbauen kann. Dabei nutzt es u.a. Acetat bei einem pH-Optimum von 8,5 (Kunz *et al.*, 1989). Die Effizienz der Produktion und des Verbrauchs von CO_2 und CH_4 war erneut pH-Wert abhängig, jedoch auch von der Zusammensetzung der Gasphase. Bei pH 6 und 7 wurden unter H_2/CO_2 -Atmosphäre der Wasserstoff (nicht gezeigt, da tw. vor Messtag verbraucht) und CO_2 verbraucht und Methan wurde produziert. Sowohl die Abnahme von CO_2 , als auch die gebildete Menge an CH_4 waren bei pH 7 größer, als bei pH 6. Die Gesamtmenge an gebildetem

Kohlenstoff in der Gasphase war bei pH 7 (H_2/CO_2 : 699,01 mg C; N_2 : 131,29 mg C) größer, als bei pH 6. Dies deckt sich mit der generellen Fermentationsausbeute. Die Konzentration an organischen Säuren war bei pH 7 ebenfalls höher und die Methanogenese sollte bei neutralem pH-Wert effizienter ablaufen. In den Ansätzen unter Stickstoffatmosphäre wurde sowohl von CO_2 als auch von CH_4 geringere Mengen produziert (bei pH 6 (H_2/CO_2) 108,65 mg C und bei pH 6 (N_2) 75,53 mg C).

Die Anzahl der Sequenzen für Archaea war unter H_2/CO_2 -Atmosphäre (pH 7: 13481, pH 6: 14607) höher, als unter N_2 Atmosphäre (pH 7: 10799, pH 6: 9420). Die dominierende Ordnung stellten die Methanobacteriales dar, wobei hauptsächlich *Methanobacterium sp.*, *M. veterum* und *M. palustris* identifiziert werden konnten. Alle Vertreter dieser Ordnung produzieren Methan hydrogenotroph aus H_2/CO_2 . Interessanterweise werden keine anderen Substrate, wie Acetat und Formiat, verwendet. Für *M. palustris* liegt der optimale pH-Wert bei 5,4 - 5,7, wobei generell ein Wachstum von pH 4,7 – 7,1 beschrieben ist (Krivushin *et al.*, 2010; Cadillo-Quiroz *et al.*, 2014). Mit einem Anteil von bis zu 0,5% trat die Ordnung der Thermoplasmatales auf, Vertreter der Ordnung Methanosarcinales waren nur in einer Probe bei pH 7 H_2/CO_2 und im Inokulum vertreten. *Methanomassiliicoccus sp.* (Thermoplasmatales) verwendet ebenfalls kein Acetat (Dridi *et al.*, 2012). Einzig *Methanosarcina sp.* ist in der Lage Methan über alle methanogenen Stoffwechselwege zu generieren, acetoclastisch über Acetat, über CO und hydrogenotroph über CO_2 und H_2 (Buan *et al.*, 2011). Der syntrophe Abbau organischer Säuren verbunden mit Methanogenese ist in Tabelle 4.1 dargestellt.

Tabelle 4.1: Syntropher Abbau organischer Säuren gekoppelt an Methanogenese und deren Gibbs-Energie.
Nach (Thauer *et al.*, 1977).

Reaktion	$\Delta G_o'$ (kJ/Reaktion)
<u>Fettsäure Oxidation</u>	
$Acetat^- + 4 H_2O \rightarrow H_2 + 2 HCO_3^- + H^+$	+ 105
$Propionat^- + 3H_2O \rightarrow Acetat^- + HCO_3^- + H^+ + 3H_2$	+ 76
$Butyrat^- + 2H_2O \rightarrow 2 Acetat^- + H^+ + 2H_2$	+ 48
<u>Wasserstoffverbrauch durch Methanogene und Acetogene</u>	
$4 H_2 + HCO_3^- + H^+ \rightarrow CH_4 + 3H_2O$	- 136
$4 H_2 + 2 HCO_3^- + H^+ \rightarrow Acetat^- + 4H_2O$	- 105
<u>Sytrophe Acetat-Oxidation verbunden mit hydrogenotrophen Methanogenen</u>	
$CH_3COO^- + H_2O \rightarrow CH_4 + HCO_3^-$	- 31

Das Produktspektrum der organischen Säuren konnte durch die Wahl der Gasphase nicht beeinflusst werden. Durch einen niedrigen Wasserstoffpartialdruck sollen vor allem Butyrat und Acetat entstehen, während ein hoher p_{H_2} die Produktion von Propionat und Laktat begünstigen soll (Hallenbeck, 2005; Mandal *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006). Ein hoher oder niedriger Wasserstoffpartialdruck hatte auf das untersuchte Konsortium nur hinsichtlich der Anzahl an Archaea-Sequenzen und die Effizienz Einfluss. Zusätzlich zur Fermentation konnte in den Ansätzen mit H_2/CO_2 auch Methan generiert werden. Durch den Einsatz einer Stickstoffgasphase bei pH 7 wurden die höchste Ausbeute an Säuren erreicht. Wie viel dabei ebenfalls wieder auf- oder abgebaut wurde, kann nur durch die Untersuchung des Transkriptoms festgestellt werden. Zum einen war die Sequenzierungstiefe nicht ausreichend, um einzelne Arten zu identifizieren und zum anderen sind nicht alle Stoffwechselwege für die detektierten Organismen untersucht. So kann nicht erklärt werden, warum in allen Ansätzen, auch mit Stickstoffatmosphäre mehr Archaea-Sequenzen (>2:1) als Bakterien-Sequenzen analysiert wurden, da die überwiegende Mehrheit der identifizierten Arten nicht fähig war ohne H_2 und CO_2 zu wachsen. Zudem wurde hier wenig Methan detektiert. Es kann in diesen Ansätzen nur der durch acidogene und acetogene Fermentationsvorgänge frei werdende Wasserstoff und Kohlendioxid genutzt werden. Wasserstoff wurde in den Ansätzen mit Stickstoffatmosphäre nicht detektiert, daher wurde es wahrscheinlich direkt weiter verwendet.

Die während der Fermentationsansätze angefertigten FISH-Bilder lieferten erst nach der Fermentation im 2-Liter Maßstab durch entsprechend angefärbte Zellen Hinweise auf Archaea. Durch die Cellulose in den Proben war die Qualität der Bilder jedoch sehr beeinträchtigt. Da keine weiteren Sequenzierungen und zuvor keine Gasphasenmessung durchgeführt wurden, kann nicht geklärt werden, ab wann die Fermentationsansätze detektierbare Mengen an Archaea enthielten.

Aus den 2-Liter-Fermentationen wurden Proben auf Pilz-DNA hin untersucht. Die verwendeten Primer können einen Großteil der beschriebenen Pilzfamilien abdecken, jedoch besteht die Möglichkeit, dass durch einen mangelnden Aufschluss oder Primer-Bindung diese nicht detektiert wurden (Raja *et al.*, 2017). In vielen biotechnologischen Bereichen werden bereits Pilze als Produzenten verwendet. Daher sind diese in nahezu allen Bereichen zu finden und über Sporenbildung durchsetzungsfähig. Generell können Pilze, so wie auch für Bakterien

beschrieben, abhängig von der Konzentration (ca. ab 30-50 mM) durch organische Säuren gehemmt werden. Passend zu den hier untersuchten Parametern können eine Vielzahl an Pilzarten Cellulasen produzieren. Daneben gibt es Arten, die organische Säuren produzieren können, anaerob vorkommen und ein breites pH-Spektrum aushalten können (Ruijter *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2003; Magnuson and Lasure, 2004; Viikari *et al.*, 2009). Generell möglich wäre demnach, dass sich unter den hier verwendeten Bedingungen Pilzarten durchsetzen können. Mit der verwendeten PCR-Methode wurden diese jedoch nicht detektiert. Daneben konnten durch die FISH-Färbungen keine Zellen gefunden werden, die darauf schließen lassen.

4.2. Abbau der organischen Säuren unter Stromproduktion

Im nächsten Schritt wurde die Effizienz der Stromproduktion aus Acetat, Propionat und Butyrat untersucht. Dazu wurde in allen Versuchen, solange nicht anders angegeben, ein bioelektrochemisches System im Amperometrie-Modus mit einem Potential von -191 mV gegen Ag/AgCl verwendet.

Zunächst wurde das Fermentat einer 1-Liter Fermentation mit den beinhalteten Bakterien getestet. In diesem Aufbau konnte innerhalb von 30 Tagen keine Stromproduktion beobachtet werden. Die Wahl der dafür verwendeten Begasung mit N_2/CO_2 und N_2 zeigte keinen Unterschied. Parallel dazu wurde steriles Fermentat als Negativkontrolle charakterisiert. Auch hier konnte keine Stromstärke bzw. -dichte gemessen werden. In dem untersuchten Fermentat waren demnach keine exoelektrogenen Mikroorganismen enthalten bzw. konnten diese die beinhalteten organischen Substanzen nicht nutzen.

Ein bereits in der Arbeitsgruppe getestetes Perkolat zeigte ein reproduzierbares Muster des Abbaus der organischen Säuren und der Stromproduktion (Schmidt *et al.*, 2018b). Auch nach einer Adaption wurden immer zuerst Acetat und Butyrat gleichzeitig abgebaut. Zeitlich versetzt begann der Abbau von Propionat. Dadurch konnte mit Perkolat eine Coulomb-Effizienz von 4-10% erreicht werden, wobei etwa eine Stromdichte von $54 \mu A/cm^2$ gemessen wurde.

Auch alle in dieser Arbeit durchgeführten Versuche mit Perkolat zeigten zunächst eine Abnahme von Acetat und Butyrat und im Anschluss von Propionat. In dem Versuch mit Anodenmedium und Perkolatinokulum konnten alle Säuren über einen Zeitraum von 25 Tagen abgebaut werden, wobei eine maximal durchschnittliche Stromdichte von $127 \mu A/cm^2$ erreicht wurde. Die Coulomb-Effizienz konnte dadurch auf 11% gesteigert werden.

Um das Konsortium des Perkolats allein (als Vorinkubation) und mit Fermentat zu verwenden, wurde das Experiment zunächst wie von Schmidt *et al.* beschrieben durchgeführt. Im Anschluss wurde das Anodenvolumen mit sterilem Fermentat gefüllt und der Abbau der beinhalteten organischen Säuren verfolgt. Durch die Verwendung des *open circuit potential*-Modus wurde der Abbau der organischen Säuren ohne Elektronenübertragung getestet werden. Ansonsten wurden die Versuche gleich aufgebaut. Im Amperometrierversuch wurde eine Steigerung der Stromdichte auf eine maximale durchschnittlich Stromdichte von $250 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ beobachtet. In beiden Modi wurden jedoch die organischen Säuren mit einer ähnlichen Abbaurate (TOC $0,2 \text{ g}/\text{l} \cdot \text{d}$) verwendet. Dadurch ergab sich eine mittlere Coulomb-Effizienz von 6%. Das hier verwendete Konsortium übertrug wahrscheinlich, wie schon von Schmidt *et al.* analysiert, die Elektronen eher auf Methan, als auf die Anode. Ob dies durch eine Potentialänderung optimiert werden kann, wurde nicht untersucht. Eine Veränderung des Potentials kann das Verhältnis der Elektronen, die auf die Anode bzw. Methan übertragen werden beeinflussen (Hari *et al.*, 2016). Das Potential pendelte sich im OCP-Versuch auf -320 mV gegen Ag/AgCl-Referenzelektrode ein. Um herauszufinden, ob ein anderes Potential die Effizienz der Stromproduktion dieses Systems steigern könnte, kann eine *linear sweep* Voltametrie durchgeführt werden. Dadurch wird ein vorgegebener Potentialbereich (z.B. -250 mV bis $+250 \text{ mV}$ gegen Ag/AgCl) mehrfach abgefahren. Die dadurch entstandene Stromstärke wird gemessen und das Maximum zeigt das Potential an, bei dem die meisten Elektronen übertragen werden können. Dadurch können Biofilme charakterisiert werden und Rückschlüsse auf deren Übertragungswege (z.B. direkt oder indirekt über Mediatoren) gezogen werden (Richter *et al.*, 2009; Ranganathan *et al.*, 2012).

Um den Anteil der Methanogenen zu verringern und die Effizienz der Stromproduktion zu steigern wurde ein Amperometrie-Versuch mit Bromo-Ethan-Sulfonat (BrES) versetzt. Bromo-Ethan-Sulfonat hemmt als Struktur analog von 2-Mercaptoethansulfonat die Methanproduktion und kann daher die Effizienz der Stromproduktion steigern (Gunsalus *et al.*, 1978; Balch and Wolfe, 1979; Mansoorian *et al.*, 2013). Durch die Verwendung von $50 \mu\text{M}$ BrES wurde die Stromdichte in diesem Versuch auf durchschnittlich $55 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ reduziert. Der Abbau der organischen Säuren wurde dadurch jedoch auch gehemmt. Vermutlich konnten hier nur die acetoclastischen Methanogenen das Acetat abbauen. Die restlichen Organismen des Perkolats konnten dies unter den getesteten Bedingungen nicht. Der Einsatz von $50 \mu\text{M}$ BrES in Perkolat führt zu einer Steigerung der Coulomb-Effizienz (Schmidt *et al.*, 2018b). Ob

dies an der Zusammensetzung des Perkolats lag oder an dem verwendeten Fermentat, wurde nicht geklärt. Durch den Einsatz von BrES konnten mit Fermentat die Effizienz und der Abbau nicht verbessert werden.

Um die CE während des Abbaus von Acetat und Butyrat aus Fermentat zu steigern könnte zum einen, wie oben beschrieben, das Potential verändert werden, damit mehr Elektronen auf die Anode, statt auf Methan übertragen werden. Zum anderen könnte eine Kokultur ohne Methanogene getestet werden, sodass ebenfalls durch diesen Schritt ein Fermentat Propionat als einzige organische Säure erhalten wird (Liu *et al.*, 2005; Miceli *et al.*, 2014).

Generell konnte hier gezeigt werden, dass mit dem Perkolat-Konsortium der Abbau aller organischen Säuren oder nur von Acetat und Butyrat möglich ist. Dadurch konnte gezielt ein Fermentat generiert werden, das nur Propionat oder keine der organischen Säuren mehr enthielt. Jedoch war die Coulomb-Effizienz mit 6% niedrig. In Versuchen mit Abwasser werden jedoch oftmals geringe CE von teilweise <10% gemessen (Hong Liu *et al.*, 2004; Jadhav and Ghangrekar, 2008; Velasquez-Orta *et al.*, 2011).

Abbau von Acetat unter Stromproduktion mit *Geobacter sulfurreducens*

Um nur eine der Säuren abzubauen, wurde *Geobacter sulfurreducens* verwendet. Da *G. sulfurreducens* zur Elektronenübertragung direkten Kontakt zum Elektronenakzeptor haben muss, also einen Biofilm an der Anode bildet, wurde mindestens mit OD_{600nm} 2 der Anodenraum vorinkubiert. Unter optimalen Bedingungen mit Anodenmedium konnte eine mittlere maximale Stromdichte von 250 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ durch den Abbau von Acetat erreicht werden. Dahingegen wurden Butyrat und Propionat nicht abgebaut. Mit Medium konnte eine CE von 22-41% erreicht. Die Anoden wurden, wie in diesem Versuch mit Medium beschrieben, mit *Geobacter sulfurreducens* vorinkubiert und im Anschluss Fermentat als Kulturmedium anaerob getestet. Dadurch konnte eine maximale Stromdichte von 200 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ generiert werden. Auch hier wurde mit einer maximalen Coulomb-Effizienz von 42% nur Acetat abgebaut. Da die Leitfähigkeit stark variierte (1400 – 4000 $\mu\text{S}/\text{cm}$) und der pH-Wert kontinuierlich in diesen Läufen abnahm, kann das die Elektronenübertragung beeinflussen haben. Die Effizienzen des Abbaus und der Stromproduktion unter optimierten Bedingungen mit Anodenmedium unterschieden sich nicht signifikant zu den Ergebnissen mit Fermentat. In einem vergleichbaren Aufbau (Leitfähigkeit und pH) mit einem Papierabwasser wurde mit 250 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ eine ähnliche Stromdichte erreicht (Velasquez-Orta *et al.*, 2011).

Durch den Einsatz von *G. sulfurreducens* konnte ein Fermentat mit zwei verbleibenden organischen Säuren produziert werden, wobei die CE im Vergleich zum Perkolatkonsortium gesteigert werden konnte. *G. sulfurreducens* besitzt die Anpassungsfähigkeit auch in Abwasserströmen zu überleben und aus solchen Strom zu produzieren. Vermutlich deshalb konnte auch hier eine ähnlich Stromstärke und Effizienz erreicht werden, wie in Medium (Kato, 2017).

4.3. Nanofiltration

Des Weiteren wurde die Möglichkeit der Ankonzentrierung von organischen Säuren in Fermentat untersucht. Dazu wurden zwei Membranen zur Nanofiltration getestet.

Der Rückhalt bei einer Nanofiltration ist nicht nur abhängig von der Größe der Substanzen in der Lösung, sondern ist auch an ihre Ladung und Interaktion miteinander gebunden. Zudem spielen neben der Zusammensetzung der Lösung weitere Parameter, wie pH-Wert oder Temperatur, eine Rolle. Diese Membranen können zur Aufbereitung von Wasser bis zur Trinkwasserqualität genutzt werden (Nyström *et al.*, 1995; Schaep *et al.*, 1998; Kelewou *et al.*, 2011). Die Zusammensetzung des Papiers konnte nicht vollständig geklärt werden und damit war nicht abschätzbar ob sich Inhaltsstoffe in Lösung begeben können. Die Zusammensetzung eines Papiers, vor allem der Additive, hängt stark von der Nutzung ab und ist nicht klar definiert (Pivnenko *et al.*, 2015; Pivnenko *et al.*, 2016).

Im Vorfeld wurden einige Analysen zum Salzgehalt und der Zusammensetzung des Fermentats am Institut für Wasserchemie und Wassertechnologie am KIT angefertigt. Daneben wurde auch hier schon mit Fermentat-Proben von pH 6 und 7 eine Filtration mit NF270 Membranen durchgeführt. Hierbei wurde der Rückhalt der untersuchten Salze und der organischen Säuren, der pH-Wert und die Leitfähigkeit analysiert. Im Fermentat konnten vor allem Cl^- , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} und Sr^{2+} nachgewiesen werden, wobei die einwertigen Ionen mit etwa 20-30% und die zweiwertigen Kationen Mg^{2+} , Ca^{2+} und Sr^{2+} mit 65-90% zurückgehalten wurden. Von Kelewou *et al.* wurde beschrieben, dass mehrwertige Salze in höherer Konzentration zurück gehalten werden, als einwertige (Kelewou *et al.*, 2011). Durch die erhöhte Salzkonzentration wurde ebenfalls die Leitfähigkeit nahezu verdoppelt, wohingegen der pH-Wert nicht verändert wurde. Der TOC-Rückhalt in diesem Aufbau lag bei maximal 90%, wobei Acetat zu maximal 89%, Propionat max. 90% und Butyrat max. 95% zurückgehalten wurden. Dabei

konnte zwischen einem Fermentat bei pH 6 und pH 7 kein Unterschied festgestellt werden. Die untersuchten Salze und organischen Säuren wurden mit steigendem Molekulargewicht vermehrt zurückgehalten. Dies liegt sowohl an der Größe der Moleküle, als auch an der Ladung. Da hier eine negativ geladene Membran genutzt wurde, wurden negativ geladene Moleküle eher zurück gehalten (Choi *et al.*, 2008; Ooi, 2016).

Im Anschluss wurde der Rückhalt zweier unterschiedlicher Fermentatflüssigkeiten mit den Membranen NF90 und NF270 getestet. Dazu wurde die Filtration bis zur Halbierung des Volumens durchgeführt und anschließend das Konzentrat und der Durchfluss untersucht. Theoretisch sollte dadurch die Konzentration bei einem 100%-igen Rückhalt verdoppelt werden. Der Fokus lag bei diesem Versuch auf dem Rückhalt des Propionats. Mit der NF90 Membran konnte ein Rückhalt für Acetat von 100%, für Propionat von 82% und für Butyrat von 41% erreicht werden. Für Acetat wurde jedoch als Summe von Durchfluss und Konzentrat eine höhere Konzentration erreicht, als im Fermentat vorhanden war. Dies ist mit einem größeren Fehler aufgrund der geringeren Konzentration zu erklären, wodurch keine Eindeutige Aussage getroffen werden kann. Auch die initiale Konzentration der zu konzentrierenden Substanzen kann den Rückhalt beeinflussen (Nyström *et al.*, 1995). Für die NF270 Membran konnte ein etwas besserer Rückhalt von 84% gezeigt werden. Beide Membranen waren demnach etwa gleich geeignet für den Rückhalt und damit die Ankonzentration von Propionat in dem untersuchten Fermentat. Während der Filtrationsvorgang mit der NF270 Membran nur einige Stunden betrug, musste zur Halbierung des Volumens mit der NF90 Membran über einen Tag filtriert werden.

4.4. Fermentat als Kultivierungsmedium zur Produktion von Acetoin

Das Fermentat wurde zuerst als Kulturflüssigkeit für *Shewanella oneidensis* und *Geobacter sulfurreducens* verwendet. Dazu wurde dieses allein und mit 0,1% Hefeextrakt zugesetzt gegen das jeweilige für das Bakterium optimierte Medium (PBS und *Geobacter*-Medium) getestet. Für *S. oneidensis* wurde das Fermentat aerob und für *G. sulfurreducens* wurde es anaerobisiert eingesetzt. Im direkten Vergleich konnte für *S. oneidensis* im Fermentat ohne Hefeextrakt nur ein sehr langsames Wachstum detektiert werden. Ohne Hefeextrakt konnte eine maximale Wachstumsrate von $\mu=0,02$ und eine Verdopplungszeit von 45 h beobachtet werden. Durch die Zugabe von Hefeextrakt konnte das Wachstum gesteigert werden, sodass

eine maximale Wachstumsrate von $\mu=0,18$ und eine Verdopplungszeit von 3,8 h erreicht wurden. In der Positivkontrolle mit PBS wurde das Wachstum dagegen mit $\mu=0,25$ und einer Verdopplungszeit von 2,8 h verbessert. Das Wachstum in Fermentat + Hefeextrakt kann auf den Anteil des Hefeextrakts zurück zu führen sein, jedoch konnte *S. oneidensis* das beinhaltete Acetat in beiden Ansätzen verwenden. In Fermentat, unabhängig von der Hefezugabe, wurde eine Abbaurrate von 0,33 mM/h detektiert. Die Abbaurrate in Medium lag bei 1,4 mM/h.

G. sulfurreducens zeigte ebenfalls in Medium die höchste Wachstumsrate von $\mu=0,74$ mit einer Verdopplungszeit von 0,9 Tagen. Durch die Zugabe von Hefe zum Fermentat war zunächst ebenfalls ein schnelleres Wachstum zu sehen, am Ende des Laufs wurde jedoch in beiden Fermentat-Versuchen eine End-OD_{600nm} von 0,5 erreicht. Auch hier zeigte das Fermentat allein eine Wachstumsrate von $\mu=0,26$ und einer Verdopplungszeit von 2,6 Tagen das langsamste Wachstum. Dieses wurde durch die Zugabe von Hefeextrakt auf $\mu=0,42$ erhöht, wodurch die Verdopplungszeit sich auf 1,6 Tage verkürzte. Im Gegensatz zu *S. oneidensis* kann *G. sulfurreducens* nicht alleine mit Hefeextrakt wachsen. Weshalb hier durch Hefezugabe die Wachstumsrate nur geringfügig erhöht werden konnte.

In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass diese beiden Organismen in der Lage waren das im Fermentat enthaltene Acetat abzubauen. Fermentat konnte als Kultivierungslösung, vor allem mit Hefeextraktzugabe, genutzt werden. Obwohl die Zusammensetzung sich zu den Kultivierungsmedien unterschieden, waren die Bestandteile nicht toxisch oder stoffwechselhemmend für *G. sulfurreducens* und *S. oneidensis*. Beide Organismen können jedoch auch in Abwasser und Schlämmen befunden werden und können sich daher an solche Umgebungen anpassen (Logan *et al.*, 2006; Dolch *et al.*, 2015; Kouzuma *et al.*, 2015; Clark *et al.*, 2016).

Der von Bursac *et al.* (Bursac *et al.*, 2017) modifizierte *S. oneidensis*-Stamm (#1039; $\Delta ackA\Delta pta$ mit pBAD-*alsSD*) wurde im Nachfolgenden Versuch in Fermentat eingesetzt, um Acetoin aus Propionat zu generieren. Dazu wurde das Wachstum und der Umsatz in PBS-Medium und wieder in Fermentat \pm Hefeextrakt bestimmt. In diesem Versuch konnte das höchste Wachstum in Fermentat + Hefeextrakt beobachtet werden. Da hier im PBS-Medium keine Hefe verwendet wurde, kann die erhöhte Wachstumsrate auf die Zugabe von Hefe zurückzuführen sein. Hier lag die Wachstumsrate bei $\mu=0,15$ bei einer Verdopplungszeit von 4,5 h. Mit PBS-Medium wurden $\mu=1,3$ und eine Verdopplungszeit von 5,4 h erreicht. In

Fermentat konnte eine Wachstumsrate von $\mu=0,1$ und eine Verdopplungszeit von 7,2 h beobachtet werden. Damit lag das Wachstum von #1039 über dem des Wildtyps in Fermentat. In PBS konnten 1,1 mM Propionat abgebaut werden aus dem mit einer 37%-igen Ausbeute 0,21 mM Acetoin produziert wurden. Da in den Ansätzen mit Fermentat die Abnahme der organischen Säuren nicht detektieren konnte, ist hier keine Berechnung der Ausbeute möglich. In Fermentat allein konnte über den Voges-Proskauer-Test 0,01 mM und in Fermentat + Hefeextrakt $0,4 \pm 0,09$ mM Acetoin produziert werden.

Damit konnte gezeigt werden, dass *S. oneidensis* #1039 generell in der Lage ist das Propionat des Fermentats in Acetoin umzuwandeln. Für eine Umsatzsteigerung müssten mögliche Nebenprodukte verringert werden oder Kosubstrate verwendet werden. Dadurch könnte eine mögliche Limitierung umgangen werden. Ebenso könnte die Produktion von Acetoin mit dem zuvor erfolgten Schritt, der Stromproduktion in BES, kombiniert werden. Durch eine Kokultur der bereits effizient stromproduzierenden Organismen *G. sulfurreducens* und *S. oneidensis* #1039 könnten Acetat und Propionat unter Acetoin- und Stromproduktion abgebaut werden. Der Erfolg ähnlicher Experimente konnte für *S. oneidensis* #1039 bereits gezeigt werden (Bursac *et al.*, 2017).

Escherichia coli als Acetoinproduzent

E. coli ist ein sehr bekannter Modellorganismus, der sich leicht genetisch verändern lässt. Da bereits eine Vielzahl an genetischen Daten vorliegt und es nahezu ubiquitär vorkommt und daher anpassungsfähig ist, wurde auch ein *E. coli* zur Acetoinproduktion verwendet. In vorangegangenen Studien wurde bereits gezeigt, dass *E. coli* K12 Propionat aerob verwenden kann (Brock *et al.*, 2002). Generell konnte für K12 gezeigt werden, dass sich dieser Stamm an saure Bedingungen adaptiert (Russell and Diez-Gonzalez, 1997). Simonte *et al.* konnte eine erhöhte Expression des Gens der RNase R in K-12 unter anaeroben Bedingungen mit Propionat als Substrat messen (Simonte *et al.*, 2017). Zuvor war dies als Stressantwort auf Bedingungen, wie Kälteschock, Limitierungen, wie Wachstum in Minimalmedium oder in der stationären Phase, beschrieben (Chen and Deutscher, 2005; Andrade *et al.*, 2006).

Zunächst wurde daher die aerobe Adaption des K12-Stamms an Propionat untersucht. Nachdem in der ersten Generation keine Abnahme und kein Wachstum des *E. coli* K12 über 17 Stunden zu beobachten war, wurde die Kultivierungszeit verlängert. Dazu wurde eine *E. coli*-Kultur jeweils nach drei Tagen Wachstum M9-Medium in neues Medium mit 20 mM

Propionat und Butyrat überführt. Im ersten Ansatz konnte kein Wachstum beobachtet werden, durch die folgenden Überführungen wurde jedoch die Verdopplungszeit deutlich verringert und die Wachstumsrate gesteigert. In der fünften Adaptionsgeneration wurde parallel zum Wachstum in M9-Medium das Wachstum in Fermentat \pm 0,1% Hefeextrakt getestet. Erst durch die Adaptation konnte überhaupt ein Verbrauch von Propionat und Butyrat gemessen werden. In der zweiten Generationen wurde das Wachstum gesteigert, jedoch konnte keine Abnahme der organischen Säuren detektiert werden. In der fünften Generation konnte in Medium eine Abbaurate von 0,14 mmol/h für Propionat und 0,12 mmol/h Butyrat erreicht werden. Die Wachstumsrate lag hier bei $\mu=0,06$, mit einer Verdopplungszeit von 12 h. In der 6. Generation wurde dies mit $\mu=0,062$ und einer Verdopplungszeit von 11 h nur noch geringfügig gesteigert, während die Abbauraten gleich blieben. In Fermentat allein wurde eine nahezu kein Wachstum mit einer Wachstumsrate von $\mu=0,01$ und eine Verdopplungszeit von 58 h gemessen. Durch die Zugabe von Hefeextrakt konnte mit $\mu=0,08$ eine höhere Wachstumsrate erreicht werden, als im Medium. Die Verdopplungszeit sank dadurch auf 9 h. Die Abbaurate in Fermentat lag bei 0,04 mmol/h für Propionat und 0,08 mmol/h für Butyrat. Durch den Zusatz von Hefe wurde Propionat mit 0,17 mmol/h und Butyrat mit 0,13 mmol/h abgebaut. Da dem M9-Medium kein Hefeextrakt zugesetzt wurde, kann der Unterschied im Wachstum an diesem liegen. Vor allem mit dem Hintergrund, dass die Limitierungen in einem Minimalmedium zu Stressantworten führen kann.

In diesem Schritt soll Fermentat verwendet werden, aus dem zuvor im BES mindestens Acetat abgereinigt wurde. Daher wurde zur Vergleichbarkeit auch dem Medium mit Butyrat und Propionat verwendet. In dem hier testeten Fermentat waren jedoch alle drei Säuren vorhanden. Das Wachstum im Medium begann in der 5. Adaptionsgeneration etwas verzögert. Dies war ebenfalls im Abbau von Propionat und Butyrat zu erkennen. Erst nach ca. 37 h wurde zunächst Propionat abgebaut, wobei der Butyratabbau nochmals zeitlich versetzt startete. In beiden Ansätzen mit Fermentat wurde zunächst Acetat verwendet und etwas zeitlich versetzt gleichzeitig Propionat und Butyrat. Obwohl *E. coli* K12 kaum Wachstum in Fermentat zeigte, wurden über 112 h etwa 24 mM Acetat, 4 mM Propionat und 8 mM Butyrat abgebaut.

Durch die Adaption an Propionat und Butyrat konnte sowohl im Medium, als auch in Fermentat der Abbau gesteigert werden. In Medium zeigte sich in der dritten Generation bereits eine deutliche Steigerung des Wachstums.

Um die Art der Adaption eingrenzen zu können wurde der adaptierte Stamm, wie zuvor in M9-Medium (K12 M9) und in LB (K12 LB) vorkultiviert. Der zuvor auf Wachstum mit Propionat und Butyrat adaptierte Stamm zeigte durch die Vorkultivierung in LB wieder eine verringerte Wachstumsrate. Während das Wachstum des K12 M9 unmittelbar begann, startete das Wachstum des K12 LB erst verzögert nach ca. einem Tag. Ebenfalls nach einem Tag setzte der Abbau von Propionat (0,13 mmol/h) und Butyrat (0,02 mmol/h) ein. K12 M9 konnte dahingegen die VFA mehr als doppelt so schnell abbauen (Propionat 0,22 mmol/h; Butyrat 0,1 mmol/h). Da der Adaptationseffekt durch eine veränderte Vorkultivierung ohne organische Säuren vermindert wurde, liegt die Vermutung nahe, dass der Effekt keinen genetischen Ursprung hat. Ansonsten hätte die Vorkultivierung keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten. Die bereits beschriebenen Effekte über die Veränderung des Transkriptoms als Folge von Stress sind wahrscheinlicher. Ebenso kann es eine Folge auf die Anwesenheit der organischen Säuren sein (Russell *and* Diez-Gonzalez, 1997). Durch den Abbau von Propionat entstehen die toxischen Zwischenprodukte Propionyl-CoA und Methyl-Citrat (Maruyama *and* Kitamura, 1985; Man *et al.*, 1995; Horwill *et al.*, 2001). Daher ist es wahrscheinlicher, dass zum Abbau dieser Produkte zunächst die Enzyme translatiert werden müssen, bevor in der Zelle toxische Intermediate akkumulieren und dies zum Zelltod führt. Da Gene, die für Enzyme bestimmter Stoffwechselwege und nicht für so genannte *house keeping* Gene kodieren, aus energetischen Gründen oftmals nur dann exprimiert werden, wenn diese gebraucht werden, spielen hier unterschiedliche Regulierungswege eine Rolle. Neben der Induktion spielen ebenfalls posttranskriptionelle Regulationen eine Rolle. Im Fall des *prp*-Operons, das die für den Abbau von Propionat benötigten Gene trägt, wurde die Exoribonuklease RNase R als Regulator von Simonte *et al.* identifiziert. Durch die Deletion des für RNase R codierenden Gens *rnr* konnte unter anaeroben Bedingungen das Wachstum deutlich gesteigert werden und auch unter aeroben Bedingungen zeigte der Stamm ein leicht gesteigertes Wachstum und eine erhöhte Abbaurrate von Propionat im Gegensatz zum *E. coli* K12 Wildtyp (Simonte *et al.*, 2017).

In dieser Arbeit wurde der *E. coli* K12 Δrnr parallel zu K12 LB und K12 M9 getestet. Dadurch zeigte sich, wie bereits beschrieben, dass die Deletionsmutante ein deutlich gesteigertes

Wachstum, nicht nur gegenüber des K12 Wildtyps, sondern auch gegenüber des K12 LB-Stamms. Zwar war hier eine längere lag-Phase von ca. 37 h zu beobachten, die End-OD_{600nm} fiel jedoch höher aus, als für K12 LB. Während der Wachstumsphase konnte eine Abbaurate von 0,1 mmol/h, wodurch die Abbauraten von K12 LB und K12 Δrnr ähnlich ausfielen. Interessanterweise konnte in der Mutante kein Abbau von Butyrat beobachtet werden. Ob die Deletion (Δrnr) ebenfalls transkriptionelle Auswirkungen auf andere Stoffwechselwege hat oder dies ebenfalls eine Stressreaktion ist, wurde nicht untersucht.

E. coli K12 Δrnr als Produktionsstamm für Acetoin

Die Deletionsmutante K12 Δrnr zeigte ohne Adaption bereits ein gesteigertes Wachstum im Gegensatz zum Wildtyp (wt) und K12 LB. Daher wurde auch dieser Stamm gewählt, um Acetoin zu produzieren. Zur Vergleichbarkeit wurde in K12 wt und K12 Δrnr die schon in *S. oneidensis* genutzten Gene pMal_alsSD eingebracht. Die Stämme wurden zur Transformation des Plasmids auf LB kultiviert. Im Anschluss wurde das Wachstum in M9-Medium mit Propionat und Butyrat getestet. Vermutlich durch die Vorinkubation ohne organische Säuren konnte über mehr als drei Tage kein Wachstum des zuvor adaptierten Stamms mit Plasmid (K12 wt + pMAL_alsSD) beobachtet werden. K12 Δrnr + pMAL_alsSD zeigte nahezu das gleiche Wachstum, wie zuvor ohne Plasmid. Hier setzte wieder nach einer lag-Phase von ca. 37 h das Wachstum ein.

Parallel dazu wurde die Produktion von Acetoin mit diesen Stämmen in einem Zellsuspensionsassay (ca. OD_{600nm} 10) detektiert. Sowohl während des Wachstumsversuchs, als auch im Zellsuspensionsassay wurde Acetoin produziert. Die Quantifizierung war hier erschwert, da Propionat und Acetoin auf dem Chromatogramm des verwendeten HPLC überlagert waren. Da die gleiche Konzentration beider Substanzen im Chromatogramm die gleiche Fläche ergab, wurde hier eine Differenz-Rechnung durchgeführt. Die Konzentration von Acetoin wurde über die kolorimetrische Voges-Proskauer-Reaktion bestimmt und diese von der Konzentration des Mischpeaks (Propionat und Acetoin) der HPLC-Messung abgezogen. Dadurch wurde die Konzentration des Propionats erhalten. In den Zellsuspensionsassays konnte für K12 Δrnr 4,2 mM Acetoin und damit eine Ausbeute von 84% und für K12 wt 3,1 mM Acetoin bei einer Ausbeute von 62% erreicht werden. Dadurch konnte in Medium gezeigt werden, dass die Konzentration und die Ausbeute an Acetoin aus Propionat

um etwa 35% durch den Einsatz der Deletionsmutante im Gegensatz zum Wildtyp gesteigert werden kann.

Da je nach vorangegangenem BES-Lauf Propionat und Butyrat oder nur Propionat weiterverwendet werden können, wurde das Wachstum des K12 wt + pMal_alsSD und des K12 Δrnr + pMal_alsSD nur mit Propionat (P), Butyrat (B) und mit beiden organischen Säuren (PB) untersucht. Dadurch stellte sich heraus, dass K12 Δrnr + pMAL_alsSD das höchste Wachstum mit Propionat zeigte, während K12 WT + pMAL_alsSD schneller mit Propionat wachsen konnte, jedoch die gleiche OD auch mit Propionat und Butyrat erreichte. Sowohl mit Propionat, als auch mit Propionat und Butyrat zeigte Δrnr + pMAL_alsSD ein schnelleres Wachstum, als WT + pMAL_alsSD. Beide Stämme zeigten nur mit Butyrat als Substrat kein Wachstum.

In einem gleich aufgebauten Zellsuspensionsassay wurde wieder kein Abbau der organischen Säuren detektiert. Es konnte mit Δrnr + pMAL_alsSD 0,5 mM Acetoin und mit WT + pMAL_alsSD bei (P) 0,4 mM, (B) 0,1 mM und (PB) 0,16 mM Acetoin produziert werden. Ein parallel gemessener K12-Stamm ohne Plasmid zeigte zwar kein Wachstum, aber den Abbau von Propionat. Im Vorfeld dieses Versuchs wurde für die plasmidtragenden Stämme über eine PCR nachgewiesen, dass die Plasmide in den Bakterien vorhanden sind. Zudem wurde eine über eine Sequenzierung direkt nach der Transformation durchgeführt, die sicherstellte, dass die eingesetzten Stämme weiterhin vorlagen. Dadurch sollten diese in der Lage sein, wie schon im vorangegangenen Versuch, die organischen Säuren zu verwenden und unter Propionatverbrauch Acetoin herzustellen.

Für diese Kultivierung wurde im Gegensatz zu den Ansätzen zuvor für das Wachstum und den Zellsuspensionsassay ein Volumen von 10 ml in Reagenzgläsern gewählt. Da hier der Sauerstoffeintrag aufgrund des kleineren Oberflächen zu Volumen Verhältnisses verglichen mit einem Erlenmeyer-Kolben, geringer ausfallen kann, war der Abbau möglicherweise durch sauerstofflimitierung beeinflusst. Jedoch wurde auf der anderen Seite trotzdem Wachstum festgestellt.

Schon in den Versuchen mit K12 WT ohne Plasmid wurde gezeigt, dass *E. coli* Propionat bevorzugt und erst mit Verzögerung auch Butyrat abbaut. In den Versuchen mit pMal_alsSD führte eine Zugabe von Butyrat in PB bei beiden Stämmen zu einem verminderten Wachstum, wobei mit Butyrat allein beide Stämme kein Wachstum zeigten. Für *Escherichia*-Stämme und auch vor allem für K12 ist beschrieben, dass dieser als Wildtyp keine organischen Säuren von

C2 bis C10 verwendet, da diese den β -Oxidationsweg nicht aktivieren. Nach einer Adaptation oder der Vorkultivierung mit längeren Fettsäuren sei dies jedoch möglich. Einige Publikationen sprechen dann jedoch schon von Mutationen (Overath *et al.*, 1969; Salanitro *and* Wegener, 1971). Zudem kann der Abbau von Butyrat bzw. ähnlich großer Fettsäuren zu der Akkumulation eines R-CoA führen, in diesem Fall Butyryl-CoA, welches toxisch wirkt (Iram *and* Cronan, 2006). Ähnlich wie für den Abbau von Propionat, unterliegt der Abbau von Butyrat verschiedenen Regulationen. Da in den Versuchen mit K12 Δrnr weniger oder kein Butyrat abgebaut wurde, scheint die Deletion auch auf die β -Oxidation oder deren Regulationen Einfluss zu haben. Der zelluläre Stress durch das zusätzliche Plasmid und dessen induzierter Expression sollte in beiden getesteten K12-Stämmen vergleichbar sein. In K12 WT mit Plasmid konnte jedoch im ersten Versuch eine Abnahme von Butyrat beobachtet werden. Jedoch konnte auch eine generelle Verringerung des Wachstums in allen Stämmen mit Butyrat beobachtet werden. Ob Butyrat hier über die bereits diskutierten hemmenden Eigenschaften einer organischen Säure (durch Akkumulation, Deprotonierung und ggf. Ansäuerung des Organismus) hinaus andere regulatorischen Eigenschaften besitzt, ist nicht bekannt.

Im letzten Schritt wurde der Umsatz der Stämme K12 Δrnr + pMal_alsSD und K12 WT + pMal_alsSD in Fermentat in Form eines Zellsuspensionsassays getestet. Parallel dazu wurde wieder ein K12 WT ohne Plasmid eingesetzt.

WT + pMal_alsSD konnte Propionat mit 0,29 mmol/h abbauen, wobei der verwendete WT mit einer Abbaurrate von 0,24 mmol/h Propionat nur ein geringfügig langsamer abbauen konnte. Dahingegen konnte Δrnr + pMal_alsSD Propionat mit 0,37 mmol/h am schnellsten abbauen, konnte jedoch wieder kein Butyrat verwenden. Mit einer Abbaurrate von 0,07 mmol/h für WT + pMal_alsSD wurde mehr Butyrat, als vom WT ohne Plasmid mit 0,02 mmol/h verwendet. Wiederum zeigte sich hier, dass die Deletion des *rnr*-Gens auch den Abbau von Butyrat hemmt bzw. beeinflusst. Generell konnte gezeigt werden, dass der Abbau der organischen Säuren auch mit *E. coli* K12 und dessen Deletionsmutante *rnr* möglich ist. Durch die Deletion wird der Abbau von Propionat auch hier beschleunigt, wohingegen Butyrat jedoch nicht abgebaut wird. Auffällig war, dass mit einer OD_{600nm} 5 maximal 11 mM Propionat abgebaut wurden, wobei nach 25 h noch mindestens 7 mM in allen Ansätzen nachgewiesen wurden. Daher lag die Vermutung nahe, dass der Abbau zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen war. Die Acetoinkonzentration konnte über eine GC-Messung ohne Beeinflussung von der

Propionatkonzentration bestimmt werden. Hierbei zeigte sich, dass in allen Ansätzen, eine Acetoin-Konzentration von ca. 1 mM entstanden war. Dadurch ergab sich eine Ausbeute von 21% für Δrnr + pMal_alsSD und 28% für WT + pMal_alsSD aus Propionat. Inwieweit Butyrat zur Acetoinproduktion verwendet werden konnte und noch kann, wurde nicht untersucht. Durch den WT-Stamm mit Plasmid konnten jedoch nur 2 mM über 25 h abgebaut werden. Generell zeigten die verwendeten Stämme sowohl in Medium, als auch in Fermentat ein ähnliches Verhalten. Dadurch, dass die Stämme in M9 mit IPTG als Induktor teilweise über eine Woche vorinkubiert wurden, damit eine ausreichende Zellzahl für die Zellsuspensionsversuche erreicht wurde, kann es hier schon zu einer Adaption gekommen sein. Jedoch wäre ein, wie mit dem Wildtyp zu Beginn beschriebenes, Adaptionsexperiment mit den transformierten Stämmen sicher hilfreich. Prinzipiell können mit einem *E. coli*-Stamm alle organischen Säuren des Fermentats aerob abgebaut werden. Mit Hilfe des pMal_alsSD - Plasmids könnte damit zumindest Propionat zur Acetoinproduktion beitragen. Falls die Energiebilanz des vorgeschalteten Schritts der Stromproduktion z.B. mit *G. sulfurreducens* aus Acetat oder Acetat und Butyrat durch ein Konsortium positiv ausfällt, ist auch dieser Schritt sinnvoll. Für einen effizienteren Abbau von Propionat ist die Δrnr – Mutante besser geeignet. Sicherlich wäre es interessant den Einfluss der Deletion Δrnr ebenfalls auf andere Stoffwechselwege, wie den Abbau von Butyrat, zu untersuchen.

5. Ausblick

Im ersten Schritt, der Fermentation, konnte ein Abwasserkonsortium an eine cellulosehaltige Biomasse etabliert werden. Als Folge der Überführungen, Adaption und wahrscheinlich auch der Nutzung zweier unterschiedlicher Papiere wurde die mikrobielle Zusammensetzung verändert. In der ersten Fermentation wurden nur Bakterien und als dominierende Ordnung Bacteroidales gefunden. Nach dem letzten hier analysierten Versuch, nach ca. 3 Jahren, konnte die Mehrzahl der identifizierten Sequenzen hydrogenotropher Archaea zugeordnet werden, wohingegen die dominierende Bakterienordnung die der Clostridiales war. Dadurch änderte sich ebenfalls das Produktspektrum. Das anfänglich pH-abhängige Produktspektrum mit veränderlichen Anteilen an Acetat, Propionat und Butyrat wurde in Richtung Acetat verschoben. Durch einen höheren pH-Wert konnte jedoch die Konzentration der organischen Säuren und später von Acetat in allen Fermentationen gesteigert werden. Der Kohlenstoffanteil der organischen Säuren war anteilig zum gesamten gelösten Kohlenstoffgehalt bei pH 6 am größten. Durch die Begasung mit H_2/CO_2 konnte Methanproduktion festgestellt werden. Die Acetatkonzentration fiel in diesen Ansätzen geringer aus als unter Stickstoffatmosphäre. Die detektierten Methanogenen sind nicht als acetoclastisch beschrieben, daher wäre interessant den Einfluss der Gasphase auf die Acetatkonzentration weiter zu untersuchen. Generell konnte hier nicht vollständig geklärt werden, welche Stoffwechselwege in dem untersuchten Konsortiums abliefen. Dafür wäre eine Transkriptomanalyse sinnvoll.

Im nächsten Schritt, dem Abbau einer oder mehr organischer Säuren unter Stromproduktion, wurde ein Perkolat-Konsortium und *Geobacter sulfurreducens* verwendet. Mit dem Perkolatkonsortium konnte entweder Acetat und Butyrat oder zusätzlich Propionat abgebaut werden. Durch den zeitlich versetzten Abbau, kann der Prozess ggf. unterbrochen werden. Hierbei wurde jedoch, wahrscheinlich durch die Anwesenheit von Methanogenen, eine geringe Coulomb-Effizienz erreicht. Durch die Verwendung von *G. sulfurreducens* konnte diese Effizienz gesteigert und gezielt nur Acetat aus dem Fermentat abgereinigt werden. Das bioelektrochemische System ist bereits als Erweiterung der Abwasseraufbereitung untersucht. Hier wurden die Versuche im batch-Modus durchgeführt, jedoch kann durch die Nutzung eines Durchlaufsystems die Effizienz gesteigert werden. Durch die Vergrößerung der Anodenfläche im Verhältnis zum Volumen des Anodenkompartments könnte ebenfalls der

Umsatz und ggf. die Effizienz des Systems gesteigert werden. Zusätzlich könnte gezielt ein exoelektrogener Butyratoxidierer zusammen mit *G. sulfurreducens* verwendet werden, statt des Perkolat-Konsortiums, um dadurch eine Effizienzsteigerung zu erreichen.

Die im Fermentat enthaltenen organischen Säuren konnten mit einem Rückhalt von mindestens 80% über eine Nanofiltrationsmembranen ankonzentriert werden. Jedoch wurde dadurch auch die Konzentration der meisten Salze erhöht. Durch die ggf. zeitsparendere Methode des Eindampfens, z.B. über einen Rotationsverdampfer, könnte ein ähnliches Ergebnis erzielt werden.

Generell konnte in Wachstumsversuchen gezeigt werden, dass das produzierte Fermentat auch nach dem Schritt im BES als Kultivierungsflüssigkeit verwendet werden kann. Mit drei zur Acetoinproduktion befähigten Stämmen (K12 Wt und Δrnr ; *S. oneidensis*#1039) konnte das Propionat aus Fermentat zur Acetoinproduktion genutzt werden. Welchen Einfluss die Deletion der RNase R, neben der Steigerung des Propionatabbaus, auf das Transkriptom eines K12-Stamms weiterhin hat, ist in Folgearbeiten abzuklären. Der offensichtlich hemmende Effekt von Butyrat auf das Wachstum und den Abbau von Propionat wurde bisher nicht beschrieben. Inwieweit eine Adaption das Wachstum, die Abbauraten und ggf. die Acetoinproduktion der transformierten Stämme (+pMal_alsSD) verbessern kann, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht erforscht, wäre jedoch ein naheliegender nächster Schritt.

6. Referenzen

Schlussbericht 2001, Herstellung von Holzpellets, Bundesamt für Energie Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft

Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe e. V. (2018)

Agler-Rosenbaum, M., Schröder, U., and Harnisch, F. (2013) Mikroben unter Strom. *Biol unserer Zeit* **43**: 96–103.

Ahmadi, N., Khosravi-Darani, K., and Mortazavian, A.M. (2017) An overview of biotechnological production of propionic acid: From upstream to downstream processes. *Electron J Biotechnol* **28**: 67–75.

Ahmed, I., Kudo, T., Abbas, S., Ehsan, M., Iino, T., Fujiwara, T., and Ohkuma, M. (2014) *Cellulomonas pakistanensis* sp. nov., a moderately halotolerant Actinobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* **64**: 2305–2311.

Akasaka, H., Ueki, A., Hanada, S., Kamagata, Y., and Ueki, K. (2003) *Propionicimonas paludicola* gen. nov., sp. nov., a novel facultatively anaerobic, Gram-positive, propionate-producing bacterium isolated from plant residue in irrigated rice-field soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 1991–1998.

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

Alizadeh, H., Teymouri, F., Gilbert, T.I., and Dale, B.E. (2005) Pretreatment of Switchgrass by Ammonia Fiber Explosion (AFEX). In *Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*. Humana Press, Totowa, NJ. pp. 1133–1141.

Amann, R.L., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., and Stahl, D.A. (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol* **56**: 1919–25.

Anderson, R.T., Vrionis, H.A., Ortiz-Bernad, I., Resch, C.T., Long, P.E., Dayvault, R., et al. (2003) Stimulating the in situ activity of *Geobacter* species to remove uranium from the groundwater of a uranium-contaminated aquifer. *Appl Environ Microbiol* **69**: 5884–91.

Andrade, J.M., Cairrao, F., and Arraiano, C.M. (2006) RNase R affects gene expression in stationary phase: regulation of ompA. *Mol Microbiol* **60**: 219–228.

Andrade, J.M., Hajnsdorf, E., Regnier, P., and Arraiano, C.M. (2009) The poly(A)-dependent degradation pathway of rpsO mRNA is primarily mediated by RNase R. *RNA* **15**: 316–326.

Angelidaki, I., Karakashev, D., Batstone, D.J., Plugge, C.M., and Stams, A.J.M. (2011) Biomethanation and Its Potential. *Methods Enzymol* **494**: 327–351.

Angioni, S., Millia, L., Mustarelli, P., Doria, E., Temporiti, M.E., Mannucci, B., et al. (2018) Photosynthetic microbial fuel cell with polybenzimidazole membrane: synergy between bacteria and algae for wastewater removal and biorefinery. *Heliyon* **4**: e00560.

Arslan, D., Steinbusch, K.J.J., Diels, L., Hamelers, H.V.M., Strik, D.P.B.T.B., Buisman, C.J.N., and Wever, H. De (2016) Selective short-chain carboxylates production: A review of control

- mechanisms to direct mixed culture fermentations. *Crit Rev Environ Sci Technol* **46**: 592–634.
- Awano, N., Rajagopal, V., Arbing, M., Patel, S., Hunt, J., Inouye, M., and Phadtare, S. (2010) *Escherichia coli* RNase R has dual activities, helicase and RNase. *J Bacteriol* **192**: 1344–52.
- Azizi Samir, M.A.S., Alloin, F., and Dufresne, A. (2005) Review of Recent Research into Cellulosic Whiskers, Their Properties and Their Application in Nanocomposite Field. *Biomacromolecules* **6**: 612–626.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., et al. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* **2**: 2006.0008.
- Bakalidou, A., Kämpfer, P., Berchtold, M., Kuhnigk, T., Wenzel, M., and König, H. (2002) *Cellulosimicrobium variabile* sp. nov., a cellulolytic bacterium from the hindgut of the termite *Mastotermes darwiniensis*. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 1185–1192.
- Balch, W.E., and Wolfe, R.S. (1979) Transport of coenzyme M (2-mercaptoethanesulfonic acid) in *Methanobacterium ruminantium*. *J Bacteriol* **137**: 264–73.
- Barbirato, F., Chedaille, D., and Bories, A. (1997) Propionic acid fermentation from glycerol: comparison with conventional substrates. *Appl Microbiol Biotechnol* **47**: 441–446.
- Batstone, D.J., Hülsen, T., Mehta, C.M., and Keller, J. (2015) Platforms for energy and nutrient recovery from domestic wastewater: A review. *Chemosphere* **140**: 2–11.
- Behling, N. (2012) Fuel cells: current technology challenges and future research needs. .
- Benner, R., Maccubbin, A.E., and Hodson, R.E. (1984) Anaerobic biodegradation of the lignin and polysaccharide components of lignocellulose and synthetic lignin by sediment microflora. *Appl Environ Microbiol* **47**: 998–1004.
- Berg, I.A., Kockelkorn, D., Buckel, W., and Fuchs, G. (2007) A 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate autotrophic carbon dioxide assimilation pathway in Archaea. *Science* **318**: 1782–6.
- Biavati I, B., Scardovi, V., and Moore, W.E.C. (1982) Electrophoretic Patterns of Proteins in the Genus *Bifidobacterium* and Proposal of Four New Species. *Int J Syst Bacteriol* **32**: 358–373.
- Blattner, F.R., Plunkett, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., et al. (1997a) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**: 1453–62.
- Blehschmidt, J. 1935- (2013) *Taschenbuch der Papiertechnik*. Hanser Verlag, .
- Boesen, T., and Nielsen, L.P. (2013) Molecular Dissection of Bacterial Nanowires. *MBio* **4**: e00270-13.
- Boga, H.I., Ludwig, W., and Brune, A. (2003) *Sporomusa aerivorans* sp. nov., an oxygen-reducing homoacetogenic bacterium from the gut of a soil-feeding termite. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 1397–1404.
- Boie, W. (1957) Vom Brennstoff zum Rauchgas: Feuerungstechnisches Rechnen mit Brennstoffkenngrößen und seine Vereinfachung mit Mitteln der Statistik. .
- Bok, F.A.M. De, Stams, A.J.M., Dijkema, C., and Boone, D.R. (2001) Pathway of Propionate Oxidation by a Syntrophic Culture of *Smithella propionica* and *Methanospirillum hungatei*. *Appl Environ Microbiol* **67**: 1800–1804.
- Bond, D.R., Holmes, D.E., Tender, L.M., and Lovley, D.R. (2002) Electrode-reducing

- microorganisms that harvest energy from marine sediments. *Science* **295**: 483–5.
- Brock, M., Maerker, C., Schütz, A., Völker, U., and Buckel, W. (2002) Oxidation of propionate to pyruvate in *Escherichia coli*: Involvement of methylcitrate dehydratase and aconitase. *Eur J Biochem* .
- Brodeur-Campbell, M., Klinger, J., and Shonnard, D. (2012) Feedstock mixture effects on sugar monomer recovery following dilute acid pretreatment and enzymatic hydrolysis. *Bioresour Technol* .
- Bruce Logan, *, †, ‡, Shaoan Cheng, †, ‡, Valerie Watson, † and, and Estadt§, G. (2007) Graphite Fiber Brush Anodes for Increased Power Production in Air-Cathode Microbial Fuel Cells. .
- Bruijn, F. de (2005) The current status of fuel cell technology for mobile and stationary applications. *Green Chem* **7**: 132.
- Buan, N., Kulkarni, G., and Metcalf, W. (2011) Genetic Methods for *Methanosarcina* Species. *Methods Enzymol* **494**: 23–42.
- Bursac, T., Gralnick, J.A., and Gescher, J. (2017) Acetoin production via unbalanced fermentation in *Shewanella oneidensis*. *Biotechnol Bioeng* **114**: 1283–1289.
- Butler, J.E., Young, N.D., and Lovley, D.R. (2010) Evolution of electron transfer out of the cell: comparative genomics of six *Geobacter* genomes. *BMC Genomics* **11**: 40.
- Caccavo, F., Lonergan, D.J., Lovley, D.R., Davis, M., Stolz, J.F., McInerney, M.J., and McInerney, M.J. (1994) *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a hydrogen- and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism. *Appl Environ Microbiol* **60**: 3752–9.
- Cadillo-Quiroz, H., Brauer, S.L., Goodson, N., Yavitt, J.B., and Zinder, S.H. (2014) *Methanobacterium paludis* sp. nov. and a novel strain of *Methanobacterium lacus* isolated from northern peatlands. *Int J Syst Evol Microbiol* **64**: 1473–1480.
- Calhoun, L.N., and Kwon, Y.M. (2010) The effect of long-term propionate adaptation on the stress resistance of *Salmonella Enteritidis*. *J Appl Microbiol* **109**: 1294–1300.
- Call, D., and Logan, B.E. (2008) Hydrogen Production in a Single Chamber Microbial Electrolysis Cell Lacking a Membrane. *Environ Sci Technol* **42**: 3401–3406.
- Campbell, J.W., Morgan-Kiss, R.M., and Cronan, J.E. (2003) A new *Escherichia coli* metabolic competency: growth on fatty acids by a novel anaerobic beta-oxidation pathway. *Mol Microbiol* **47**: 793–805.
- Campione, A., Gurreri, L., Ciofalo, M., Micale, G., Tamburini, A., and Cipollina, A. (2018) Electrodialysis for water desalination: A critical assessment of recent developments on process fundamentals, models and applications. *Desalination* **434**: 121–160.
- Cao, X., Huang, X., Liang, P., Xiao, K., Zhou, Y., Zhang, X., and Logan, B.E. (2009) A new method for water desalination using microbial desalination cells. *Environ Sci Technol* **43**: 7148–52.
- Carmalin Sophia, A., Bhalambaal, V.M., Lima, E.C., and Thirunavoukkarasu, M. (2016) Microbial desalination cell technology: Contribution to sustainable waste water treatment process, current status and future applications. *J Environ Chem Eng* **4**: 3468–3478.
- cellulase - Protein - NCBI (2018) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=cellulase>. Accessed October 21, 2018.
- Chandra, R., Yadav, S., and Kumar, V. (2015) Microbial Degradation of Lignocellulosic Waste

- and Its Metabolic Products. In *Environmental Waste Management*. CRC Press, pp. 249–298.
- Chaudhuri, S.K., and Lovley, D.R. (2003) Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. *Nat Biotechnol* **21**: 1229–1232.
- Chen, C., and Deutscher, M.P. (2005) Elevation of RNase R in Response to Multiple Stress Conditions. *J Biol Chem* **280**: 34393–34396.
- Cheng, S., Xing, D., Call, D.F., and Logan, B.E. (2009) Direct Biological Conversion of Electrical Current into Methane by Electromethanogenesis. *Environ Sci Technol* **43**: 3953–3958.
- Cheng, Z.-F., and Deutscher, M.P. (2002) Purification and Characterization of the *Escherichia coli* Exoribonuclease RNase R. *J Biol Chem* **277**: 21624–21629.
- Choi, J.-H., Fukushi, K., and Yamamoto, K. (2008) A study on the removal of organic acids from wastewaters using nanofiltration membranes. *Sep Purif Technol* **59**: 17–25.
- Choonut, A., Yunu, T., Pichid, N., and Sangkharak, K. (2015) Ethanol Production from Reused Liquid Stillage. *Energy Procedia* **79**: 808–814.
- Chun, A.Y., Yunxiao, L., Ashok, S., Seol, E., and Park, S. (2014) Elucidation of toxicity of organic acids inhibiting growth of *Escherichia coli* W. *Biotechnol Bioprocess Eng* **19**: 858–865.
- Clark, D. (1981) Regulation of fatty acid degradation in *Escherichia coli*: analysis by operon fusion. *J Bacteriol* **148**: 521–6.
- Clark, D.P., Pazdernik, N.J., Clark, D.P., and Pazdernik, N.J. (2016) Environmental Biotechnology. *Biotechnology* 393–418.
- Coppi, M. V, Leang, C., Sandler, S.J., and Lovley, D.R. (2001) Development of a genetic system for *Geobacter sulfurreducens*. *Appl Env Microbiol* .
- Coral, J., Karp, S.G., Porto de Souza Vandenberghe, L., Parada, J.L., Pandey, A., and Soccol, C.R. (2008) Batch Fermentation Model of Propionic Acid Production by *Propionibacterium acidipropionici* in Different Carbon Sources. *Appl Biochem Biotechnol* **151**: 333–341.
- Creasey, R.C.G., Mostert, A.B., Nguyen, T.A.H., Viridis, B., Freguia, S., and Laycock, B. (2018) Microbial nanowires – Electron transport and the role of synthetic analogues. *Acta Biomater* **69**: 1–30.
- DeLong, E.F., Wickham, G.S., and Pace, N.R. (1989) Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* **243**: 1360–3.
- Demirel, B., and Scherer, P. (2008) The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. *Rev Environ Sci Bio/Technology* **7**: 173–190.
- Ding, Y.-H.R., Hixson, K.K., Aklujkar, M.A., Lipton, M.S., Smith, R.D., Lovley, D.R., and Mester, T. (2008) Proteome of *Geobacter sulfurreducens* grown with Fe(III) oxide or Fe(III) citrate as the electron acceptor. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* **1784**: 1935–1941.
- Dolch, K., Danzer, J., Kabbeck, T., Bierer, B., Erben, J., Förster, A.H., et al. (2014) Characterization of microbial current production as a function of microbial electrode-interaction. *Bioresour Technol* **157**: 284–292.
- Dolch, K., Wuske, J., and Gescher, J. (2015) Genomic barcode-based analysis of exoelectrogens in wastewater biofilms grown on anode surfaces. *J Microbiol Biotechnol* .
- Dong, X., Plugge, C.M., and Stams, A.J. (1994) Anaerobic degradation of propionate by a

- mesophilic acetogenic bacterium in coculture and triculture with different methanogens. *Appl Environ Microbiol* **60**: 2834–8.
- Dridi, B., Fardeau, M.-L., Ollivier, B., Raoult, D., and Drancourt, M. (2012) *Methanomassiliicoccus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**: 1902–1907.
- Du, Z., Li, H., and Gu, T. (2007) A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnol Adv* **25**: 464–482.
- Dubé, C.-D., and Guiot, S.R. (2015) Direct Interspecies Electron Transfer in Anaerobic Digestion: A Review. Springer, Cham, pp. 101–115.
- Dürre, P. (2014) Physiology and Sporulation in *Clostridium*. *Microbiol Spectr* **2**.
- Dzink, J.L., Sheenan, M.T., and Socransky, S.S. (1990) Proposal of Three Subspecies of *Fusobacterium nucleatum* Knorr 1922: *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* subsp. nov., comb. nov.; *Fusobacterium nucleatum* subsp. *polymorphum* subsp. nov., nom. rev., comb. nov.; and *Fusobacterium nucleatum* subsp. *vincent*. *Int J Syst Bacteriol* **40**: 74–78.
- Ellilä, S., Fonseca, L., Uchima, C., Cota, J., Goldman, G.H., Saloheimo, M., et al. (2017) Development of a low-cost cellulase production process using *Trichoderma reesei* for Brazilian biorefineries. *Biotechnol Biofuels* **10**: 30.
- ElMekawy, A., Hegab, H.M., Dominguez-Benetton, X., and Pant, D. (2013) Internal resistance of microfluidic microbial fuel cell: Challenges and potential opportunities. *Bioresour Technol* **142**: 672–682.
- Esquivel-Elizondo, S., Ilhan, Z.E., Garcia-Peña, E.I., and Krajmalnik-Brown, R. (2017) Insights into Butyrate Production in a Controlled Fermentation System via Gene Predictions. *mSystems* **2**.
- Etchebehere, C., Errazquin, M.I., Dabert, P., Moletta, R., and Muxi, L. (2001) *Comamonas nitrativorans* sp. nov., a novel denitrifier isolated from a denitrifying reactor treating landfill leachate. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 977–983.
- Filya, I., Sucu, E., and Karabulut, A. (2004) The effect of *Propionibacterium acidipropionici*, with or without *Lactobacillus plantarum*, on the fermentation and aerobic stability of wheat, sorghum and maize silages. *J Appl Microbiol* **97**: 818–826.
- Förster, A.H., Beblawy, S., Golitsch, F., and Gescher, J. (2017) Electrode-assisted acetoin production in a metabolically engineered *Escherichia coli* strain. *Biotechnol Biofuels* **10**: 65.
- Franzmann, P.D., Liu, Y., Balkwill, D.L., Aldrich, H.C., Conway De Macario, E., and Boone, D.R. (1997) *Methanogenium frigidum* sp. nov., a Psychrophilic, H₂-Using Methanogen from Ace Lake, Antarctica. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 1068–1072.
- Fukuzaki, S., Nishio, N., Shobayashi, M., and Nagai, S. (1990) Inhibition of the Fermentation of Propionate to Methane by Hydrogen, Acetate, and Propionate. *Appl Environ Microbiol* **56**: 719–723.
- Gavrilescu, D. (2008) Energy from biomass in pulp and paper mills. *Environ Eng Manag* .
- Ghosh, P.K., Saxena, R.K., Gupta, R., Yadav, R.P., and Davidson, S. (1996) Microbial lipases: production and applications. *Sci Prog* **79 (Pt 2)**: 119–57.
- Gonzalez-Garcia, R., McCubbin, T., Navone, L., Stowers, C., Nielsen, L., and Marcellin, E. (2017)

Microbial Propionic Acid Production. *Fermentation* **3**: 21.

Gorby, Y.A., Yanina, S., McLean, J.S., Rosso, K.M., Moyles, D., Dohnalkova, A., *et al.* (2006) Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proc Natl Acad Sci* **103**: 11358–11363.

Groleau, D., and Forsberg, C.W. (1981) Cellulolytic activity of the rumen bacterium *Bacteroides succinogenes*. *Can J Microbiol* **27**: 517–30.

Gude, V.G. (2016) Wastewater treatment in microbial fuel cells – an overview. *J Clean Prod* **122**: 287–307.

Gunsalus, R.P., Romesser, J.A., and Wolfe, R.S. (1978) Preparation of coenzyme M analogues and their activity in the methyl coenzyme M reductase system of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Biochemistry* **17**: 2374–7.

Hallenbeck, P.C. (2005) Fundamentals of the fermentative production of hydrogen. *Water Sci Technol* **52**: 21–9.

Han, Y.W., and Srinivasan, V.R. (1968) Isolation and characterization of a cellulose-utilizing bacterium. *Appl Microbiol* .

Hari, A.R., Katuri, K.P., Gorron, E., Logan, B.E., and Saikaly, P.E. (2016) Multiple paths of electron flow to current in microbial electrolysis cells fed with low and high concentrations of propionate. *Appl Microbiol Biotechnol* **100**: 5999–6011.

Hartshorne, R.S., Reardon, C.L., Ross, D., Nuester, J., Clarke, T.A., Gates, A.J., *et al.* (2009) Characterization of an electron conduit between bacteria and the extracellular environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 22169–74.

Heidelberg, J.F., Paulsen, I.T., Nelson, K.E., Gaidos, E.J., Nelson, W.C., Read, T.D., *et al.* (2002) Genome sequence of the dissimilatory metal ion–reducing bacterium *Shewanella oneidensis*. *Nat Biotechnol* **20**: 1118–1123.

Heidrich, E.S., Curtis, T.P., and Dolfig, J. (2011) Determination of the Internal Chemical Energy of Wastewater. *Environ Sci Technol* **45**: 827–832.

Hernandez, M.E., and Newman, D.K. (2001) Extracellular electron transfer. *Cell Mol Life Sci* **58**: 1562–1571.

Hindatu, Y., Annuar, M.S.M., and Gumel, A.M. (2017) Mini-review: Anode modification for improved performance of microbial fuel cell. *Renew Sustain Energy Rev* **73**: 236–248.

Hofstad, T., Olsen, I., Eribe, E.R., Falsen, E., Collins, M.D., and Lawson, P.A. (2000) *Dysgonomonas* gen. nov. to accommodate *Dysgonomonas gadei* sp. nov., an organism isolated from a human gall bladder, and *Dysgonomonas capnocytophagoideis* (formerly CDC group DF-3). *Int J Syst Evol Microbiol* **50**: 2189–2195.

Holmes, D., Finneran, K., ... R.O.-A. (2002) Enrichment of members of the family Geobacteraceae associated with stimulation of dissimilatory metal reduction in uranium-contaminated aquifer sediments. *Am Soc Microbiol* .

Holmes, D.E., Bond, D.R., and Lovley, D.R. (2004) Electron transfer by *Desulfobulbus propionicus* to Fe(III) and graphite electrodes. *Appl Environ Microbiol* **70**: 1234–7.

Holmes, D.E., O’Neil, R.A., Vrionis, H.A., N’Guessan, L.A., Ortiz-Bernad, I., Larrahondo, M.J., *et al.* (2007) Subsurface clade of Geobacteraceae that predominates in a diversity of Fe(III)-

reducing subsurface environments. *ISME J* **1**: 663–677.

Holtzapple, M.T., Lundeen, J.E., Sturgis, R., Lewis, J.E., and Dale, B.E. (1992) Pretreatment of Lignoceilulosic Municipal Solid Waste by Ammonia Fiber Explosion (AFEX). *Applied Biochemistry and Biotechnology* **5**: 3435.

Hong Liu, †, Ramanathan Ramnarayanan, ‡ and Bruce E. Logan*, †, § (2004) Production of Electricity during Wastewater Treatment Using a Single Chamber Microbial Fuel Cell. .

Hong Liu, †, Stephen Grot, ‡ and Bruce E. Logan*, † (2005) Electrochemically Assisted Microbial Production of Hydrogen from Acetate. .

Horswill, A.R., Dudding, A.R., and Escalante-Semerena, J.C. (2001) Studies of Propionate Toxicity in *Salmonella enterica* Identify 2-Methylcitrate as a Potent Inhibitor of Cell Growth. *J Biol Chem* **276**: 19094–19101.

Horswill, A.R., and Escalante-Semerena, J.C. (1997) Propionate catabolism in *Salmonella typhimurium* LT2: two divergently transcribed units comprise the prp locus at 8.5 centisomes, prpR encodes a member of the sigma-54 family of activators, and the prpBCDE genes constitute an operon. *J Bacteriol* **179**: 928–40.

Inanc, B., Matsui, S., and Ide, S. (1999) Propionic acid accumulation in anaerobic digestion of carbohydrates: An investigation on the role of hydrogen gas. *Water Sci Technol* **40**: 93–100.

Iram, S.H., and Cronan, J.E. (2006) The beta-oxidation systems of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* are not functionally equivalent. *J Bacteriol* **188**: 599–608.

Jadhav, G.S., and Ghangrekar, M.M. (2008) Improving Performance of MFC by Design Alteration and Adding Cathodic Electrolytes. *Appl Biochem Biotechnol* **151**: 319–332.

Jiang, X., Hu, J., Petersen, E.R., Fitzgerald, L.A., Jackan, C.S., Lieber, A.M., et al. (2013) Probing single- to multi-cell level charge transport in *Geobacter sulfurreducens* DL-1. *Nat Commun* **4**: 2751.

Julie M. Stevens, Oliver Daltrop, James W. A. Allen, and Ferguson*, S.J. (2004) C-type Cytochrome Formation: Chemical and Biological Enigmas. .

Kamide, K. (2005) Cellulose and cellulose derivatives: Recent advances in physical chemistry. *Biopolym Adv Polym Sci vol 83 Springer, Berlin, Heidelb* .

Kamide, K., and Saito, M. (1987) Cellulose and cellulose derivatives: Recent advances in physical chemistry. In *Biopolymers*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg. pp. 1–56.

Kang, H.-C., Park, Y.-H., and Go, S.-J. (2003) Growth inhibition of a phytopathogenic fungus, *Colletotrichum* species by acetic acid. *Microbiol Res* **158**: 321–326.

Karpathy, S.E., Qin, X., Gioia, J., Jiang, H., Liu, Y., Petrosino, J.F., et al. (2007) Genome sequence of *Fusobacterium nucleatum* subspecies *polymorphum* - a genetically tractable *fusobacterium*. *PLoS One* **2**: e659.

Kaspar, H.F., and Wuhrmann, K. (1978) Kinetic parameters and relative turnovers of some important catabolic reactions in digesting sludge. *Appl Environ Microbiol* **36**: 1–7.

Kato, S. (2017) Influence of Anode Potentials on Current Generation and Extracellular Electron Transfer Paths of *Geobacter* Species. *Int J Mol Sci* **18**.

Kelewou, H., Lhassani, A., Merzouki, M., Drogui, P., and Sellamuthu, B. (2011) Salts retention by nanofiltration membranes: Physicochemical and hydrodynamic approaches and modeling.

Desalination **277**: 106–112.

Kim, D.-H., Han, S.-K., Kim, S.-H., and Shin, H.-S. (2006) Effect of gas sparging on continuous fermentative hydrogen production. *Int J Hydrogen Energy* **31**: 2158–2169.

Kipf, E., Koch, J., Geiger, B., Erben, J., Richter, K., Gescher, J., et al. (2013) Systematic screening of carbon-based anode materials for microbial fuel cells with *Shewanella oneidensis* MR-1. *Bioresour Technol* **146**: 386–392.

Klash, A., Ncube, E., Toit, B. du, and Meincken, M. (2010) Determination of the cellulose and lignin content on wood fibre surfaces of eucalypts as a function of genotype and site. *Eur J For Res* **129**: 741–748.

Klinge, H. (1989) Brennwert. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 271–284.

Köpke, M., Straub, M., and Dürre, P. (2013) *Clostridium difficile* Is an Autotrophic Bacterial Pathogen. *PLoS One* **8**: e62157.

Kouzuma, A., Kasai, T., Hirose, A., and Watanabe, K. (2015) Catabolic and regulatory systems in *Shewanella oneidensis* MR-1 involved in electricity generation in microbial fuel cells. *Front Microbiol* **6**: 609.

Krivushin, K. V., Shcherbakova, V.A., Petrovskaya, L.E., and Rivkina, E.M. (2010) *Methanobacterium veterum* sp. nov., from ancient Siberian permafrost. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**: 455–459.

Kumar, R., and Wyman, C.E. (2009) Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies. *Biotechnol Prog* **25**: 302–314.

Kunz, D.A., Nagappan, O., Sáez, L.P., Luque-Romero, M.M., Moreno-Vivián, C., Castillo, F., et al. (1989) Cyanase-mediated utilization of cyanate in *Pseudomonas fluorescens* NCIB 11764. *Appl Environ Microbiol* **55**: 256–8.

Kurr, M., Huber, R., König, H., Jannasch, H.W., Fricke, H., Trincone, A., et al. (1991) *Methanopyrus kandleri*, gen. and sp. nov. represents a novel group of hyperthermophilic methanogens, growing at 110°C. *Arch Microbiol* **156**: 239–247.

Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA Sequencing. *Nucleic acid Tech Bact Syst* .

Lee, K.T., Doan, T. Van, Yoo, K., Choi, S., Kim, C., and Park, J. (2010) Discovery of commonly existing anode biofilm microbes in two different wastewater treatment MFCs using FLX Titanium pyrosequencing. *Appl Microbiol Biotechnol* .

Lee, S.K., and Keasling, J.D. (2005) A propionate-inducible expression system for enteric bacteria. *Appl Environ Microbiol* **71**: 6856–62.

Lee, S.K., and Keasling, J.D. (2008) Heterologous protein production in *Escherichia coli* using the propionate-inducible pPro system by conventional and auto-induction methods. *Protein Expr Purif* **61**: 197–203.

Lee, S.K., Newman, J.D., and Keasling, J.D. (2005) Catabolite Repression of the Propionate Catabolic Genes in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*: Evidence for Involvement of the Cyclic AMP Receptor Protein. *J Bacteriol* **187**: 2793–2800.

Leitão, V.O., Noronha, E.F., Camargo, B.R., Hamann, P.R.V., Steindorff, A.S., Quirino, B.F., et al. (2017) Growth and expression of relevant metabolic genes of *Clostridium thermocellum*

cultured on lignocellulosic residues. *J Ind Microbiol Biotechnol* .

Leys, D., Tsapin, A.S., Neilson, K.H., Meyer, T.E., Cusanovich, M.A., and Beeumen, J.J. Van (1999) Structure and mechanism of the flavocytochrome c fumarate reductase of *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Nat Struct Biol* **6**: 1113–1117.

Lier, J.B. Van, Grolle, K.C., Frijters, C.T., Stams, A.J., and Lettinga, G. (1993) Effects of acetate, propionate, and butyrate on the thermophilic anaerobic degradation of propionate by methanogenic sludge and defined cultures. *Appl Environ Microbiol* **59**: 1003–11.

Lin, W.C., Coppi, M. V, and Lovley, D.R. (2004) *Geobacter sulfurreducens* Can Grow with Oxygen as a Terminal Electron Acceptor. *Appl Environ Microbiol* **70**: 2525–2528.

Lingen, H.J. van, Plugge, C.M., Fadel, J.G., Kebreab, E., Bannink, A., and Dijkstra, J. (2016) Thermodynamic Driving Force of Hydrogen on Rumen Microbial Metabolism: A Theoretical Investigation. *PLoS One* **11**: e0161362.

Liu, H., Cheng, S., and Logan, B.E. (2005) Production of electricity from acetate or butyrate using a single-chamber microbial fuel cell. *Environ Sci Technol* **39**: 658–62.

Liu, L., Zhu, Y., Li, J., Wang, M., Lee, P., Du, G., and Chen, J. (2012) Microbial production of propionic acid from propionibacteria: Current state, challenges and perspectives. *Crit Rev Biotechnol* **32**: 374–381.

Liu, Y., Li, R., Wang, J., Zhang, X., Jia, R., Gao, Y., and Peng, H. (2017) Increased enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse by a novel glucose- and xylose-stimulated β -glucosidase from *Anoxybacillus flavithermus* subsp. *yunnanensis* E13T. *BMC Biochem* **18**: 4.

Logan, B.E., Hamelers, B., Rozendal, R., Schröder, U., Keller, J., Freguia, S., et al. (2006) Microbial fuel cells: Methodology and technology. *Environ Sci Technol* .

Logan, B.E., and Regan, J.M. (2006) Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. *Trends Microbiol* **14**: 512–518.

Logan, B.E., Zikmund, E., Yang, W., Rossi, R., Kim, K.-Y., Saikaly, P.E., and Zhang, F. (2018) Impact of Ohmic Resistance on Measured Electrode Potentials and Maximum Power Production in Microbial Fuel Cells. *Environ Sci Technol* **52**: 8977–8985.

Lovley, D.R., Coates, J.D., Blunt-Harris, E.L., Phillips, E.J.P., and Woodward, J.C. (1996) Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature* **382**: 445–448.

Lynd, L.R., Weimer, P.J., Zyl, W.H. van, and Pretorius, I.S. (2002) Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 506–77, table of contents.

Madden, R.H., Bryder, M.J., and Poole, N.J. (1982) Isolation and Characterization of an Anaerobic, Cellulolytic Bacterium, *Clostridium papyrosolvans* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **32**: 87–91.

Magnuson, J.K., and Lasure, L.L. (2004) Organic Acid Production by Filamentous Fungi. In *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine*. Springer US, Boston, MA. pp. 307–340.

Malvankar, N.S., Lau, J., Nevin, K.P., Franks, A.E., Tuominen, M.T., and Lovley, D.R. (2012) Electrical conductivity in a mixed-species biofilm. *Appl Environ Microbiol* **78**: 5967–71.

Man, W.-J., Li, Y., David O'Connor, C., and Wilton, D.C. (1995) The binding of propionyl-CoA and carboxymethyl-CoA to *Escherichia coli* citrate synthase. *Biochim Biophys Acta - Protein*

Struct Mol Enzymol **1250**: 69–75.

Mandal, B., Nath, K., and Das, D. (2006) Improvement of Biohydrogen Production Under Decreased Partial Pressure of H₂ by *Enterobacter cloacae*. *Biotechnol Lett* **28**: 831–835.

Manfredi, A.P., Perotti, N.I., and Martínez, M.A. (2015) Cellulose degrading bacteria isolated from industrial samples and the gut of native insects from Northwest of Argentina. *J Basic Microbiol* **55**: 1384–1393.

Mansoorian, H.J., Mahvi, A.H., Jafari, A.J., Amin, M.M., Rajabizadeh, A., and Khanjani, N. (2013) Bioelectricity generation using two chamber microbial fuel cell treating wastewater from food processing. *Enzyme Microb Technol* **52**: 352–357.

Marsili, E., Baron, D.B., Shikhare, I.D., Coursolle, D., Gralnick, J.A., and Bond, D.R. (2008) *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 3968–73.

Maruyama, K., and Kitamura, H. (1985) Mechanisms of growth inhibition by propionate and restoration of the growth by sodium bicarbonate or acetate in *Rhodopseudomonas sphaeroides* S. *J Biochem* **98**: 819–824.

Massana, R., Murray, A.E., Preston, C.M., and DeLong, E.F. (1997) Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic Archaea in the Santa Barbara Channel. *Appl Environ Microbiol* **63**: 50–6.

Méndez Arias, J., Modesto, L.F.A., Polikarpov, I., and Pereira, N. (2016) Design of an enzyme cocktail consisting of different fungal platforms for efficient hydrolysis of sugarcane bagasse: Optimization and synergism studies. *Biotechnol Prog* .

Methe, B.A., Nelson, K.E., Eisen, J.A., Paulsen, I.T., Nelson, W., Heidelberg, J.F., et al. (2003) Genome of *Geobacter sulfurreducens*: Metal Reduction in Subsurface Environments. *Science (80-)* **302**: 1967–1969.

Meyer, T.E., Tsapin, A.I., Vandenberghe, I., Smet, L. De, Frishman, D., Nealson, K.H., et al. (2004) Identification of 42 Possible Cytochrome C Genes in the *Shewanella oneidensis* Genome and Characterization of Six Soluble Cytochromes. *Omi A J Integr Biol* **8**: 57–77.

Miceli, J.F., Garcia-Peña, I., Parameswaran, P., Torres, C.I., and Krajmalnik-Brown, R. (2014) Combining microbial cultures for efficient production of electricity from butyrate in a microbial electrochemical cell. *Bioresour Technol* .

Mielenz, J.R. (2001) Ethanol production from biomass: technology and commercialization status. *Curr Opin Microbiol* **4**: 324–329.

Miller, T.L., and Wolin, M.J. (1996) Pathways of acetate, propionate, and butyrate formation by the human fecal microbial flora. *Appl Environ Microbiol* .

Mitchell, R.J., Kim, J.-S., Jeon, B.-S., and Sang, B.-I. (2009) Continuous hydrogen and butyric acid fermentation by immobilized *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755: Effects of the glucose concentration and hydraulic retention time. *Bioresour Technol* **100**: 5352–5355.

Monserate, E., Leschine, S.B., and Canale-Parola, E. (2001) *Clostridium hungatei* sp. nov., a mesophilic, N₂-fixing cellulolytic bacterium isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 123–132.

Moon, R.J., Martini, A., Nairn, J., Simonsen, J., and Youngblood, J. (2011) Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. *Chem Soc Rev* **40**: 3941.

- Mowat, C.G., **and** Chapman, S.K. (2005) Multi-heme cytochromes—new structures, new chemistry. *Dalt Trans* 3381.
- Müller, N., Worm, P., Schink, B., Stams, A.J.M., *and* Plugge, C.M. (2010) Syntrophic butyrate and propionate oxidation processes: from genomes to reaction mechanisms. *Environ Microbiol Rep* **2**: 489–499.
- Murray, W.D. (1986) Symbiotic Relationship of *Bacteroides cellulosolvens* and *Clostridium saccharolyticum* in Cellulose Fermentation. *Appl Environ Microbiol* **51**: 710–4.
- Myers, C.R., *and* Myers, J.M. (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. *J Bacteriol* **179**: 1143–52.
- Navone, L., McCubbin, T., Gonzalez-Garcia, R.A., Nielsen, L.K., *and* Marcellin, E. (2018) Genome-scale model guided design of *Propionibacterium* for enhanced propionic acid production. *Metab Eng Commun* **6**: 1–12.
- Nevin, K.P., Richter, H., Covalla, S.F., Johnson, J.P., Woodard, T.L., Orloff, A.L., *et al.* (2008) Power output and columbic efficiencies from biofilms of *Geobacter sulfurreducens* comparable to mixed community microbial fuel cells. *Environ Microbiol* .
- Nevin, K.P., Woodard, T.L., Franks, A.E., Summers, Z.M., *and* Lovley, D.R. (2010) Microbial electrosynthesis: feeding microbes electricity to convert carbon dioxide and water to multicarbon extracellular organic compounds. *MBio* **1**.
- Nisha, M., Saranyah, K., Shankar, M., *and* Saleena, L.M. (2017) Enhanced saccharification of lignocellulosic agricultural biomass *and* increased bioethanol titre using acclimated *Clostridium thermocellum* DSM1313. *3 Biotech* **7**: 35.
- Nishiyama, T., Ueki, A., Kaku, N., Watanabe, K., *and* Ueki, K. (2009) *Bacteroides graminisolvens* sp. nov., a xylanolytic anaerobe isolated from a methanogenic reactor treating cattle waste. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**: 1901–1907.
- Nyström, M., Kaipia, L., *and* Luque, S. (1995) Fouling and retention of nanofiltration membranes. *J Memb Sci* **98**: 249–262.
- Ooi, B.S. (2016) Organic Acids Recovery by Nanofiltration. In *Encyclopedia of Membranes*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. pp. 1431–1432.
- Overath, P., Pauli, G., *and* Schairer, H.U. (1969) Fatty acid degradation in *Escherichia coli*: requirement of cyclic adenosine monophosphate and cyclic adenosine monophosphate receptor protein for enzyme synthesis. *J Bacteriol* **117**: 1178–1183.
- Palacios, S., *and* Escalante-Semerena, J.C. (2000) *prpR*, *ntrA*, and *ihf* functions are required for expression of the *prpBCDE* operon, encoding enzymes that catabolize propionate in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* LT2. *J Bacteriol* **182**: 905–10.
- Pandey, P., Shinde, V.N., Deopurkar, R.L., Kale, S.P., Patil, S.A., *and* Pant, D. (2016) Recent advances in the use of different substrates in microbial fuel cells toward wastewater treatment and simultaneous energy recovery. *Appl Energy* **168**: 706–723.
- Pant, D., Bogaert, G. Van, Diels, L., *and* Vanbroekhoven, K. (2010) A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production. *Bioresour Technol* **101**: 1533–1543.
- Park, H.S., Kim, B.H., Kim, H.S., Kim, H.J., Kim, G.T., Kim, M., *et al.* (2001) A Novel

- Electrochemically Active and Fe(III)-reducing Bacterium Phylogenetically Related to *Clostridium butyricum* Isolated from a Microbial Fuel Cell. *Anaerobe* **7**: 297–306.
- Perot, C., Sargent, M., Richard, P., Luu, R.P.T., and Millot, N. (1988) The effects of pH, temperature and agitation speed on sludge anaerobic hydrolysis-acidification. *Environ Technol Lett* **9**: 741–752.
- Pham, C.A., Jung, S.J., Phung, N.T., Lee, J., Chang, I.S., Kim, B.H., *et al.* (2003) A novel electrochemically active and Fe(III)-reducing bacterium phylogenetically related to *Aeromonas hydrophila*, isolated from a microbial fuel cell. *FEMS Microbiol Lett* **223**: 129–134.
- Pivnenko, K., Eriksson, E., and Astrup, T.F. (2015) Waste paper for recycling: Overview and identification of potentially critical substances. *Waste Manag* **45**: 134–142.
- Pivnenko, K., Olsson, M.E., Götze, R., Eriksson, E., and Astrup, T.F. (2016) Quantification of chemical contaminants in the paper and board fractions of municipal solid waste. *Waste Manag* **51**: 43–54.
- Piwowarek, K., Lipińska, E., Hać-Szymańczuk, E., Kieliszek, M., and Ścibisz, I. (2018) *Propionibacterium* spp.-source of propionic acid, vitamin B12, and other metabolites important for the industry. *Appl Microbiol Biotechnol* **102**: 515–538.
- Poletto, M., Pistor, V., and J., A. (2013) Structural Characteristics and Thermal Properties of Native Cellulose. In *Cellulose - Fundamental Aspects*. InTech, .
- Potter, M.C. (1911) Electrical Effects Accompanying the Decomposition of Organic Compounds. *Proc R Soc B Biol Sci* **84**: 260–276.
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B.M., Ludwig, W., Peplies, J., and Glöckner, F.O. (2007) SILVA: A comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res* .
- Pu, Y., Hu, F., Huang, F., Davison, B.H., and Ragauskas, A.J. (2013) Assessing the molecular structure basis for biomass recalcitrance during dilute acid and hydrothermal pretreatments. *Biotechnol Biofuels* **6**: 15.
- Puls, J., Poutanen, K., Körner, H.U., and Viikari, L. (1985) Biotechnical utilization of wood carbohydrates after steaming pretreatment. *Appl Microbiol Biotechnol* .
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., *et al.* (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* .
- Rabaey, K., and Rozendal, R.A. (2010) Microbial electrosynthesis — revisiting the electrical route for microbial production. *Nat Rev Microbiol* **8**: 706–716.
- Ragsdale, S.W., and Pierce, E. (2008) Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO(2) fixation. *Biochim Biophys Acta* **1784**: 1873–98.
- Rainey, F.A., Dorsch, M., Morgan, H.W., and Stackebrandt, E. (1992) 16S rDNA Analysis of *Spirochaeta thermophila*: Its Phylogenetic Position and Implications for the Systematics of the Order Spirochaetales. *Syst Appl Microbiol* .
- Raja, H.A., Miller, A.N., Pearce, C.J., and Oberlies, N.H. (2017) Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *J Nat Prod* **80**: 756–770.

- Ranganathan, S., Tee, T.W., Chowdhury, A., Zomorodi, A.R., Yoon, J.M., Fu, Y., *et al.* (2012) An integrated computational *and* experimental study for overproducing fatty acids in *Escherichia coli*. *Metab Eng* **14**: 687–704.
- Raskin, L., Stromley, J.M., Rittmann, B.E., *and* Stahl, D.A. (1994) Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Appl Environ Microbiol*.
- Reguera, G., McCarthy, K.D., Mehta, T., Nicoll, J.S., Tuominen, M.T., *and* Lovley, D.R. (2005) Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature* **435**: 1098–1101.
- Richter, H., Nevin, K.P., Jia, H., Lowy, D.A., Lovley, D.R., *and* Tender, L.M. (2009) Cyclic voltammetry of biofilms of wild type and mutant *Geobacter sulfurreducens* on fuel cell anodes indicates possible roles of OmcB, OmcZ, type IV pili, and protons in extracellular electron transfer. *Energy Environ Sci* **2**: 506.
- Rieser, G., Scherer, S., *and* Wenning, M. (2012) *Naumannella halotolerans* gen. nov., sp. nov., a Gram-positive coccus of the family Propionibacteriaceae isolated from a pharmaceutical clean room and from food. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**: 3042–3048.
- Robert, C., Chassard, C., Lawson, P.A., *and* Bernalier-Donadille, A. (2007) *Bacteroides cellulosilyticus* sp. nov., a cellulolytic bacterium from the human gut microbial community. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**: 1516–1520.
- Rocco, C.J., *and* Escalante-Semerena, J.C. (2010) In *Salmonella enterica*, 2-methylcitrate blocks gluconeogenesis. *J Bacteriol* **192**: 771–8.
- Rodrigues, M.L., Oliveira, T.F., Pereira, I.A.C., *and* Archer, M. (2006) X-ray structure of the membrane-bound cytochrome c quinol dehydrogenase NrfH reveals novel haem coordination. *EMBO J* **25**: 5951–5960.
- Rodriguez, B.A., Stowers, C.C., Pham, V., *and* Cox, B.M. (2014) The production of propionic acid, propanol and propylene via sugar fermentation: an industrial perspective on the progress, technical challenges and future outlook. *Green Chem* **16**: 1066–1076.
- Roller, S.D., Bennetto, H.P., Delaney, G.M., Mason, J.R., Stirling, J.L., *and* Thurston, C.F. (2008) Electron-transfer coupling in microbial fuel cells: 1. comparison of redox-mediator reduction rates and respiratory rates of bacteria. *J Chem Technol Biotechnol* **34**: 3–12.
- Rosenbaum, M.A., *and* Franks, A.E. (2014) Microbial catalysis in bioelectrochemical technologies: status quo, challenges and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**: 509–518.
- Rotaru, A.-E., Shrestha, P.M., Liu, F., Shrestha, M., Shrestha, D., Embree, M., *et al.* (2014) A new model for electron flow during anaerobic digestion: direct interspecies electron transfer to *Methanosaeta* for the reduction of carbon dioxide to methane. *Energy Environ Sci* **7**: 408–415.
- Ruijter, G.J.G., Kubicek, C.P., *and* Visser, J. (2002) Production of Organic Acids by Fungi. In *Industrial Applications*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. pp. 213–230.
- Russell, J.B., *and* Diez-Gonzalez, F. (1997) The Effects of Fermentation Acids on Bacterial Growth. *Adv Microb Physiol* **39**: 205–234.
- Sakamoto, M. (2014) The Family Porphyromonadaceae. In *The Prokaryotes*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. pp. 811–824.
- Sakata, T., *and* Yajima, T. (1984) Influence of short chain fatty acids on the epithelial cell

- division of digestive tract. *Q J Exp Physiol* **69**: 639–648.
- Sakdaronnarong, C.K., Thanosawan, S., Chaithong, S., Sinbuathong, N., and Jeraputra, C. (2013) Electricity production from ethanol stillage in two-compartment MFC. *Fuel* **107**: 382–386.
- Salanitro, J.P., and Wegener, W.S. (1971) Growth of *Escherichia coli* on short-chain fatty acids: nature of the uptake system. *J Bacteriol* **108**: 893–901.
- Salmond, C. V., Kroll, R.G., and Booth, I.R. (1984) The Effect of Food Preservatives on pH Homeostasis in *Escherichia coli*. *Microbiology* **130**: 2845–2850.
- Sawatdeenarunat, C., Surendra, K.C., Takara, D., Oechsner, H., and Khanal, S.K. (2015) Anaerobic digestion of lignocellulosic biomass: Challenges and opportunities. *Bioresour Technol* **178**: 178–186.
- Schaep, J., Bruggen, B. Van der, Vandecasteele, C., and Wilms, D. (1998) Retention Mechanisms in Nanofiltration. In *Chemistry for the Protection of the Environment 3*. Springer US, Boston, MA. pp. 117–125.
- Schauenstein, E., Saenger, W., Schaur, R.J., Desoye, G., and Schreibmayer, W. (1980) Der Einfluß des pH, der Temperatur und der Polarität des Lösungsmittels auf die Absorption des reduzierten und oxidierten Nicotinamidadenin-dinucleotids. *Zeitschrift für Naturforsch C* .
- Schmidt, A., Sturm, G., Lapp, C.J., Siebert, D., Saravia, F., Horn, H., et al. (2018a) Development of a production chain from vegetable biowaste to platform chemicals. *Microb Cell Fact* **17**: 90.
- Schröder, U. (2007) Anodic electron transfer mechanisms in microbial fuel cells and their energy efficiency. *Phys Chem Chem Phys* **9**: 2619–29.
- Schröder, U., Harnisch, F., and Angenent, L.T. (2015) Microbial electrochemistry and technology: terminology and classification. *Energy Environ Sci* **8**: 513–519.
- Schuetz, B., Schicklberger, M., Kuermann, J., Spormann, A.M., and Gescher, J. (2009) Periplasmic electron transfer via the c-type cytochromes MtrA and FccA of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Appl Environ Microbiol* **75**: 7789–96.
- Schulmand, M.D., and Valentino, D. (1976) Factors influencing rumen fermentation: effect of hydrogen on formation of propionate. *J Dairy Sci* **59**: 1444–51.
- Schwalb, C., Chapman, S.K., and Reid, G.A. (2003) The tetraheme cytochrome CymA is required for anaerobic respiration with dimethyl sulfoxide and nitrite in *Shewanella oneidensis*. *Biochemistry* **42**: 9491–9497.
- Sebastien Kerisit, *,†, Kevin M. Rosso, †, Michel Dupuis, † and, Valiev‡, M. (2007) Molecular Computational Investigation of Electron-Transfer Kinetics Across Cytochrome–Iron Oxide Interfaces. .
- Segura, D., Mahadevan, R., Juárez, K., and Lovley, D.R. (2008) Computational and Experimental Analysis of Redundancy in the Central Metabolism of *Geobacter sulfurreducens*. *PLoS Comput Biol* **4**: e36.
- Shan, L., Zhang, Z., Yu, Y., Ambuchi, J.J., and Feng, Y. (2017) Performance of CSTR–EGSB–SBR system for treating sulfate-rich cellulosic ethanol wastewater and microbial community analysis. *Environ Sci Pollut Res* .
- Shi, J., Ebrik, M.A., and Wyman, C.E. (2011) Sugar yields from dilute sulfuric acid and sulfur

- dioxide pretreatments and subsequent enzymatic hydrolysis of switchgrass. *Bioresour Technol* .
- Shi, L., Deng, S., Marshall, M.J., Wang, Z., Kennedy, D.W., Dohnalkova, A.C., *et al.* (2008) Direct involvement of type II secretion system in extracellular translocation of *Shewanella oneidensis* outer membrane cytochromes MtrC and OmcA. *J Bacteriol* **190**: 5512–6.
- Shi, L., Rosso, K.M., Clarke, T.A., Richardson, D.J., Zachara, J.M., and Fredrickson, J.K. (2012) Molecular Underpinnings of Fe(III) Oxide Reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Front Microbiol* **3**: 50.
- Shi, L., Squier, T.C., Zachara, J.M., and Fredrickson, J.K. (2007) Respiration of metal (hydr)oxides by *Shewanella* and *Geobacter*: a key role for multiheme c-type cytochromes. *Mol Microbiol* **65**: 12–20.
- Simonte, F.M., Dötsch, A., Galego, L., Arraiano, C., and Gescher, J. (2017) Investigation on the anaerobic propionate degradation by *Escherichia coli* K12. *Mol Microbiol* **103**: 55–66.
- Sleutels, T.H.J.A., Lodder, R., Hamelers, H.V.M., and Buisman, C.J.N. (2009) Improved performance of porous bio-anodes in microbial electrolysis cells by enhancing mass and charge transport. *Int J Hydrogen Energy* **34**: 9655–9661.
- Snider, R.M., Strycharz-Glaven, S.M., Tsoi, S.D., Erickson, J.S., and Tender, L.M. (2012) Long-range electron transport in *Geobacter sulfurreducens* biofilms is redox gradient-driven. *Proc Natl Acad Sci* **109**: 15467–15472.
- Stackebrandt, E., Cummins, C.S., and Johnson, J.L. (2006) Family Propionibacteriaceae: The Genus *Propionibacterium*. In *The Prokaryotes*. Springer New York, New York, NY. pp. 400–418.
- Stackebrandt, E., Rainey, F.A., and Ward-Rainey, N.L. (1997) Proposal for a New Hierarchic Classification System, Actinobacteria classis nov. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 479–491.
- Stowers, C.C., Cox, B.M., and Rodriguez, B.A. (2014) Development of an industrializable fermentation process for propionic acid production. *J Ind Microbiol Biotechnol* **41**: 837–852.
- Stronach, S.M., Rudd, T., and Lester, J.N. (1986) *Anaerobic Digestion Processes in Industrial Wastewater Treatment*. Springer Berlin Heidelberg, .
- Sturm, G., Richter, K., Doetsch, A., Heide, H., Louro, R.O., and Gescher, J. (2015) A dynamic periplasmic electron transfer network enables respiratory flexibility beyond a thermodynamic regulatory regime. *ISME J* **9**: 1802–1811.
- Szczodrak, J., Trojanowski, J., Ilczuk, Z., and Ginalska, G. (1982) Cellulolytic activity of moulds. I. Characteristics of the cellulases complex and xylanase of the strain *Aspergillus terreus* F-413. *Acta Microbiol Pol* **31**: 257–270.
- Taherzadeh, M.J., and Karimi, K. (2008) Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *Int J Mol Sci* **9**: 1621–51.
- TerAvest, M.A., and Ajo-Franklin, C.M. (2016) Transforming exoelectrogens for biotechnology using synthetic biology. *Biotechnol Bioeng* **113**: 687–697.
- Teufel, R., Kung, J.W., Kockelkorn, D., Alber, B.E., and Fuchs, G. (2009) 3-Hydroxypropionyl-Coenzyme A Dehydratase and Acryloyl-Coenzyme A Reductase, Enzymes of the Autotrophic 3-Hydroxypropionate/4-Hydroxybutyrate Cycle in the Sulfolobales. *J Bacteriol* **191**: 4572–4581.

- Textor, S., Wendisch, V.F., Graaf, A.A. De, Müller, U., Linder, M.I., Linder, D., and Buckel, W. (1997) Propionate oxidation in *Escherichia coli*: Evidence for operation of a methylcitrate cycle in bacteria. *Arch Microbiol* **168**: 428–436.
- Thauer, R.K., Jungermann, K., and Decker, K. (1977) Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol Rev* **41**: 100–80.
- Tozakidis, I.E.P., Brossette, T., Lenz, F., Maas, R.M., and Jose, J. (2016) Proof of concept for the simplified breakdown of cellulose by combining *Pseudomonas putida* strains with surface displayed thermophilic endocellulase, exocellulase and β -glucosidase. *Microb Cell Fact* .
- Tsang, A.W., Horswill, A.R., and Escalante-Semerena, J.C. (1998) Studies of regulation of expression of the propionate (prpBCDE) operon provide insights into how *Salmonella typhimurium* LT2 integrates its 1,2-propanediol and propionate catabolic pathways. *J Bacteriol* **180**: 6511–8.
- Tsurumi, R., Takeda, K., and Tonouchi, A. (2000) Characteristics and Propionate Production of *Propionibacterium* Isolated from a Methane fermentation Digester. *Microbes Environ* **15**: 151–159.
- Ueno, Y., Sasaki, D., Fukui, H., Haruta, S., Ishii, M., and Igarashi, Y. (2006) Changes in bacterial community during fermentative hydrogen and acid production from organic waste by thermophilic anaerobic microflora. *J Appl Microbiol* **101**: 331–343.
- Vargas, M., Malvankar, N.S., Tremblay, P.-L., Leang, C., Smith, J.A., Patel, P., et al. (2013) Aromatic amino acids required for pili conductivity and long-range extracellular electron transport in *Geobacter sulfurreducens*. *MBio* **4**: e00105-13.
- Velasquez-Orta, S.B., Head, I.M., Curtis, T.P., and Scott, K. (2011) Factors affecting current production in microbial fuel cells using different industrial wastewaters. *Bioresour Technol* **102**: 5105–5112.
- Venkateswaran, K., Moser, D.P., Dollhopf, M.E., Lies, D.P., Saffarini, D.A., MacGregor, B.J., et al. (1999) Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **49**: 705–724.
- Viikari, L., Suurnäkki, A., Grönqvist, S., Raaska, L., and Ragauskas, A. (2009) Forest Products: Biotechnology in Pulp and Paper Processing. *Encycl Microbiol* 80–94.
- Vital, M., Karch, A., and Pieper, D.H. (2017) Colonic Butyrate-Producing Communities in Humans: an Overview Using Omics Data. *mSystems* **2**.
- Wang, Z., Jin, Y., and Yang, S.-T. (2015) High cell density propionic acid fermentation with an acid tolerant strain of *Propionibacterium acidipropionici*. *Biotechnol Bioeng* **112**: 502–511.
- Weiss, L. (1975) Stoffwechsel der Lipide. In *Physiologische Chemie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. pp. 321–376.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols*. .
- Wiesmann, U., Choi, I.S., and Dombrowski, E.-M. (2007) Fundamentals of biological wastewater treatment. Wiley-VCH, .
- Yang, B., Dai, Z., Ding, S.-Y., and Wyman, C.E. (2011) Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. *Biofuels* **2**: 421–449.

- Ye, N.-F., Lü, F., Shao, L.-M., Godon, J.-J., and He, P.-J. (2007) Bacterial community dynamics and product distribution during pH-adjusted fermentation of vegetable wastes. *J Appl Microbiol* **103**: 1055–1065.
- Yin, C.-R., Seo, D.-I., Kim, M.-K., and Lee, S.-T. (2000) Inhibitory effect of hardwood lignin on acetate-utilizing methanogens in anaerobic digester sludge. *Biotechnol Lett* **22**: 1531–1535.
- Yoon, J.H., Kang, S.J., Schumann, P., and Oh, T.-K. (2007) *Cellulosimicrobium terreum* sp. nov., isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**: 2493–2497.
- You, Y., Li, P., Lei, F., Xing, Y., and Jiang, J. (2017) Enhancement of ethanol production from green liquor-ethanol-pretreated sugarcane bagasse by glucose-xylose cofermentation at high solid loadings with mixed *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biotechnol Biofuels* .
- Yoza, B.A., and Masutani, E.M. (2013) The analysis of macroalgae biomass found around Hawaii for bioethanol production. *Environ Technol (United Kingdom)* .
- Yu, H., Huang, G.H., Zhang, X.D., and Li, Y. (2010) Inhibitory Effects of Organic Acids on Bacteria Growth During Food Waste Composting. *Compost Sci Util* **18**: 55–63.
- Zhang, F., Zhang, Y., Chen, M., Loosdrecht, M.C.M. van, and Zeng, R.J. (2013) A modified metabolic model for mixed culture fermentation with energy conserving electron bifurcation reaction and metabolite transport energy. *Biotechnol Bioeng* **110**: 1884–1894.
- Zhang, T., Cui, C., Chen, S., Yang, H., and Shen, P. (2008) The direct electrocatalysis of *Escherichia coli* through electroactivated excretion in microbial fuel cell. *Electrochem. communication* **10**: 293–297.
- Zhou, L., Yang, X., Xu, J., Shi, M., Wang, F., Chen, C., and Xu, J. (2015) Depolymerization of cellulose to glucose by oxidation–hydrolysis. *Green Chemistry* **17**: 1519–1524.
- Zhou, M., Chi, M., Luo, J., He, H., and Jin, T. (2011) An overview of electrode materials in microbial fuel cells. *J Power Sources* **196**: 4427–4435.
- Zhou, M., Zhou, J., Tan, M., Du, J., Yan, B., Wong, J.W.C., and Zhang, Y. (2017) Enhanced carboxylic acids production by decreasing hydrogen partial pressure during acidogenic fermentation of glucose. *Bioresour Technol* **245**: 44–51.

Anhang

Tabelle A1: Rückhalt der organischen Komponenten während der Nanofiltrationsversuche am Institut für Wasserchemie und Wassertechnologie.

Probenbezeichnung	Proben ID	Filtrationszeit	el Leitfähig-	e. Leit-	pH-Wert	gemessener	DOC	DOC-Rückhalt[%]
		min	keit	Rückhalt[%]		DOC		
			mS/cm			mg/L	mg/L	
V1_pH6_Rohwasser	FS-023-16-0013	0	3.64	0.0	7.63	51.94	543.4	
V1_pH6_P1		2	1.57	57.6	6.98			
V1_pH6_P2	FS-023-16-0014	6	2.48	35.1	7.38	7.93	79.0	88
V1_pH6_P3		9	2.58	34.0	7.37			
V1_pH6_P4	FS-023-16-0015	12	2.62	34.5	7.36	9.83	98.0	87
V1_pH6_P5		16	2.69	34.7	7.42			
V1_pH6_P6	FS-023-16-0016	20	2.74	35.3	7.44	10.85	108.5	88
V1_pH6_P7		25	2.78	36.6	7.43			
V1_pH6_P8	FS-023-16-0017	30	2.82	37.8	7.45	12.05	122.4	89
V1_pH6_P9		35	2.86	38.9	7.47			
V1_pH6_P10	FS-023-16-0018	40	2.88	40.4	7.46	13.11	131.1	90
V1_pH6_P11		46	2.93	41.5	7.51			
V1_pH6_P12	FS-023-16-0019	51	3.00	41.9	7.53	15.31	153.9	90
V1_pH6_P13		56	3.04	42.7	7.46			
V1_pH6_P14	FS-023-16-0020	62	3.11	43.3	7.49	18.06	182.5	90
V1_pH6_P15		67	3.19	43.4	7.50			
V1_pH6_P16	FS-023-16-0021	72	3.30	43.0	7.47	23.15	234.4	88
V1_pH6_P17		79	3.42	42.9	7.53			
V1_pH6_P18	FS-023-16-0022	87	3.61	42.1	7.54	34.14	344.7	85
V1_pH6_Konzentrat	FS-023-16-0023		6.23		7.62	113.20	2228.5	

V2_pH7_Rohwasser	FS-023-16-0024	0	4.82		7.64	104.20	1057.9	
V2_pH7_P1		2	2.91	40.3				
V2_pH7_P2	FS-023-16-0025	6	3.17	36.5	7.61	17.49	175.5	85.2
V2_pH7_P3		10	3.25	36.4				
V2_pH7_P4	FS-023-16-0026	15	3.31	37.0	7.69	20.48	205.9	85.0
V2_pH7_P5		20	3.36	37.8				
V2_pH7_P6	FS-023-16-0027	25	3.42	38.3	7.70	23.17	231.7	85.3
V2_pH7_P7		30	3.50	38.5				
V2_pH7_P8	FS-023-16-0028	36	3.55	39.5	7.70	26.00	264.7	85.4
V2_pH7_P9		42	3.63	39.9				
V2_pH7_P10	FS-023-16-0029	48	3.70	40.4	7.71	30.73	305.6	85.2
V2_pH7_P11		55	3.75	41.5				
V2_pH7_P12	FS-023-16-0030	62	3.80	42.6	7.73	34.34	342.0	85.4
V2_pH7_P13		69	3.92	42.5				
V2_pH7_P14	FS-023-16-0031	77	4.00	43.3	7.83	41.46	413.3	84.5
V2_pH7_P15		85	4.12	43.4				
V2_pH7_P16	FS-023-16-0032	93	4.24	43.6	7.88	50.65	501.2	83.3
V2_pH7_P17		101	4.38	43.5				
V2_pH7_P18	FS-023-16-0033	110	4.59	42.7	7.90	65.97	657.0	80.4
V2_pH7_Konzentrat	FS-023-16-0034		8.01		8.00	173.40	4020.1	

Tabelle A1: Analyse der Salzmengen während der Nanofiltration. Analysiert auch am Institut für Wasserchemie und Wassertechnologie.

Proben- bezeichnung	NO ₃ ⁻	Cl ⁻	Cl ⁻ Rückh alt [%]	PO ₄ ³⁻	SO ₄ ²⁻	Na ⁺	Na ⁺ Rückh alt [%]	K ⁺	K ⁺ Rückh alt [%]	Mg ²⁺	Mg ²⁺ Rückh alt [%]	Ca ²⁺	Ca ²⁺ Rückh alt [%]	Al ³⁺	Fe (2+/3+)	Sr ²⁺	Sr ²⁺ Rückh alt [%]
	mg/L	mg/L		mg/L	mg/L	mg/L		mg/L		mg/L		mg/L		µg/L	µg/L	µg/L	
V1_pH6_Roh wasser	mg/L	mg/L		mg/L	mg/L	mg/L		mg/L		mg/L		mg/L		µg/L	µg/L	µg/L	
V1_pH6_P1	<0,3	762		9	2	593		8		33		208		<5	<10	501	
V1_pH6_P2																	
V1_pH6_P3	1.3	660	14.0	<0,3	<0,3	443	28	7	14.9	6	84.5	81	65.7	<5	<10	154	73.6
V1_pH6_P4																	
V1_pH6_P5	1.4	688	11.0	<0,3	<0,3	462	27	7	24.2	7	84.6	90	65.8	<5	<10	177	73.2
V1_pH6_P6																	
V1_pH6_P7	1.3	702	10.0	<0,3	<0,3	477	28	7	23.5	8	85.1	98	67.5	<5	3413	192	75.0
V1_pH6_P8																	
V1_pH6_P9	1.2	736	6.8	<0,3	<0,3	489	30	7	28.9	9	86.3	103	70.3	<5	<10	206	77.1
V1_pH6_P10																	
V1_pH6_P11	1.3	726	9.0	<0,3	<0,3	501	31	7	30.3	9	87.5	107	72.7	<5	<10	215	79.2
V1_pH6_P12																	
V1_pH6_P13	<0,3	741	8.3	<0,3	<0,3	513	33	8	33.6	10	88.1	115	74.1	<5	<10	233	80.3
V1_pH6_P14																	
V1_pH6_P15	<0,3	767	6.3	<0,3	<0,3	541	33	8	35.5	11	88.5	124	75.0	<5	<10	251	81.1
V1_pH6_P16																	
V1_pH6_P17	<0,3	777	6.1	<0,3	<0,3	579	31	8	34.6	12	87.9	139	74.4	<5	<10	291	80.1
V1_pH6_P18																	
V1_pH6_Konz entrat	<0,3	796	5.3	<0,3	<0,3	634	29	9	33.5	16	86.9	166	72.9	<5	<10	357	78.5
V2_pH7_P1	<0,3	700		<0,3	1	1142		8		30		123		<5	95	418	
V2_pH7_P2																	
V2_pH7_P3	1.4	693	-50.3	<0,3	<0,3	699	41	5	39.8	6	81.9	38	71.3	<5	<10	115	74.3

V2_pH7_P4																	
V2_pH7_P5	1.4	693	-48.3	<0,3	<0,3	730	42	5	43.9	7	81.4	41	72.7	<5	<10	131	74.8
V2_pH7_P6																	
V2_pH7_P7	1.4	712	-50.2	<0,3	<0,3	762	44	6	36.6	7	82.3	44	74.4	<5	<10	141	76.3
V2_pH7_P8																	
V2_pH7_P9	<0,3	717	-48.8	<0,3	<0,3	798	45	6	44.4	8	82.6	48	75.2	<5	<10	156	77.0
V2_pH7_P10																	
V2_pH7_P11	<0,3	719	-46.6	<0,3	<0,3	847	45	6	46.2	9	83.3	51	76.7	<5	<10	169	78.0
V2_pH7_P12																	
V2_pH7_P13	1.3	714	-42.7	<0,3	<0,3	877	47	6	48.7	9	84.7	53	78.6	<5	<10	175	80.1
V2_pH7_P14																	
V2_pH7_P15	1.1	709	-38.8	<0,3	<0,3	944	47	7	49.0	10	84.7	59	78.9	<5	<10	193	80.5
V2_pH7_P16																	
V2_pH7_P17	1.2	697	-33.6	<0,3	<0,3	1008	48	7	49.2	12	84.9	63	79.8	<5	<10	216	80.6
V2_pH7_P18																	
V2_pH7_Konz entrat	<0,3	681	-27.5	<0,3	<0,3	1112	46	8	47.1	14	83.7	76	78.2	<5	<10	256	79.4
	<0,3	700		9.7994 942	4	2066		15		86		350		116	361	1245	