

**Untersuchungen zur Nutzung von Knallgasbakterien als
Biokatalysator in einem aeroben
Elektrosyntheseprozess zur stofflichen Nutzung von CO₂**

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

JOHANNES EBERHARD REINER

Dekan: Prof. Manfred Wilhelm

1. Referent: Prof. Johannes Gescher

2. Referent: Prof. Harald Horn

Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2019

ERKLÄRUNG AN EIDES STATT

Eidesstattliche Versicherung gemäß § 13 Absatz 2 Ziffer 3 der Promotionsordnung des Karlsruher Instituts für Technologie für die KIT Fakultät für Chemie und Biowissenschaften:

1. Bei der eingereichten Dissertation handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.
2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.
3. Die Arbeit oder Teile davon habe ich bislang nicht an einer Hochschule des In- oder Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt.
4. Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärungen bestätige ich.
5. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erklärt und nichts verschwiegen habe.

Ort und Datum

Unterschrift

VERÖFFENTLICHUNGEN, KONFERENZBEITRÄGE UND WORKSHOPS

Reiner, J.E., Geiger, K., Hackbarth, M., Fink, M., Lapp, C.J., Jung, T., Dötsch, A., Hügler, M., Wagner, M., Wilcke, W., Kerzenmacher, S., Horn, H., Gescher, J. (2019) From an extremophilic community to an electroautotrophic production strain: Towards a polyhydroxyalkanoates production using a cathodic biofilm. *ISME J. (in press)*

Reiner, J.E., Jung, T., Lapp, C.J., Siedler, M., Bunk, B., Overmann, J., and Gescher, J. (2018) *Kyrpidia spormannii* sp. nov., a thermophilic, hydrogen-oxidizing, facultative autotroph, isolated from hydrothermal systems at São Miguel Island, and emended description of the genus *Kyrpidia*. *Int J Syst Evol Microbiol* 68: 3735-3740

Reiner, J.E., Lapp, C.J., Bunk, B., Spröer, C., Overmann, J., and Gescher, J. (2018) Complete Genome Sequence of *Kyrpidia* sp. Strain EA-1, a Thermophilic Knallgas Bacterium, Isolated from the Azores. *Genome Announc* 6: e01505-17

Sturm, G., Brunner, S., Suvorova, E., Dempwolff, F., Reiner, J.E., Graumann, P., et al. (2018) Chromate Resistance Mechanisms in *Leucobacter chromiirestiens*. *Appl Environ Microbiol* 84: e02208-18

- | | |
|----------------|---|
| Oktober 2019 | ISMET7, <i>International society for microbial electrochemistry and technology</i> , global conference, Okinawa (JP) – <u>Vortrag</u> (Best Oral Presentation Award). |
| Juli 2019 | 3 rd MEEP Symposium, <i>Microbial and Enzymatic Electrochemistry Platform</i> , European Fuel Cell Forum, Luzern (CH) – <u>Vortrag</u> . |
| Oktober 2018 | Plattforminitiative " <i>Mikrobielle Bioelektrochemie</i> ", Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe – <u>Vortrag</u> . |
| April 2018 | Jahrestagung der <i>Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie</i> , Wolfsburg – <u>Posterpräsentation</u> . |
| Oktober 2017 | Jahreskonferenz der Innovationsallianz <i>Zero Carbon Footprint</i> , Mannheim – <u>Vortrag</u> . |
| Februar 2017 | <i>Bioelectrochemical Systems</i> , Symposium, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe – <u>Posterpräsentation</u> . |
| Mai 2016 | DECHEMA Himmelfahrtstagung - <i>New Frontiers for Biotech Processes</i> , Koblenz – <u>Vortrag</u> . |
| Juni/Juli 2018 | <i>Hopkins Microbiology Course</i> , Stanford University, Hopkins Marine Station, Pacific Grove, USA. |
| Mai 2017 | nova Session: <i>Bio-based Building Blocks and Polymers – Markets, Trends and Innovations</i> , Köln. |

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung	VII
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis.....	X
Abkürzungsverzeichnis.....	XII
I. Einleitung	1
1.1 Kohlenstoffdioxid als Treibhausgas	1
1.2 Stoffliche Nutzung von Kohlenstoffdioxid	3
1.3 Autotrophe Mikroorganismen in der Biotechnologie	5
1.3.1 CO ₂ -Fixierungswege.....	6
1.3.1.1 Calvin-Zyklus.....	7
1.3.1.2 Wood-Ljungdahl-Weg.....	8
1.3.1.3 Acetyl-CoA/Succinyl-CoA-Wege.....	11
1.3.2 Formen der Autotrophie	12
1.4 Mikrobielle elektrochemische Technologien	14
1.4.1 Extrazellulärer Elektronentransport	17
1.4.1.1 EET auf eine Anode.....	17
1.4.1.2 EET von einer Kathode	21
1.5 Mikrobielle Elektrosynthese – Status quo.....	24
1.6 Vorarbeiten	28
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit	28
II. Material und Methoden.....	29
2.1 Mikroorganismen.....	29
2.2 Chemikalien.....	29
2.3 Rauchgasentnahme	29
2.4 Aufbau der bioelektrochemischen Systeme	30
2.4.1 Mikrobielle Elektrosynthesereaktor	30

2.4.2	Fließzellperipherie	32
2.5	Bakterienzüchtung und Stammkulturerhaltung	33
2.5.1	Kulturmedien	33
2.5.2	Kultivierungsbedingungen	39
2.5.3	Stammkonservierung	40
2.6	Elektrochemische Methoden.....	40
2.6.1	Chronoamperometrie	40
2.6.2	Lineare Voltammetrie	42
2.7	Mikroskopische Methoden.....	42
2.7.1	Phasenkontrast und Fluoreszenzmikroskopie.....	42
2.7.1.1	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).....	43
2.7.1.2	<i>Live-Dead</i> -Färbung.....	46
2.7.1.3	Nilrot-Färbung.....	47
2.7.2	Optische Kohärenztomographie.....	47
2.8	Molekularbiologische Methoden.....	48
2.8.1	DNA-Amplifikation	48
2.8.2	DNA-Quantifizierung	49
2.8.3	DNA-Isolierung und Aufreinigung.....	50
2.8.4	RNA-Isolierung und Aufreinigung	51
2.8.5	Sequenzierungen.....	52
2.8.5.1	Sanger-Sequenzierung	52
2.8.5.2	Genomsequenzierung.....	52
2.8.5.3	RNA-Sequenzierung.....	53
2.9	Bioinformatische Methoden	53
2.9.1	BLAST	53
2.9.2	TYGS	53
2.9.3	MEGA	54
2.9.4	Genom-Assemblierung.....	54
2.9.5	Vergleichende Transkriptomanalyse	54

2.10	Analytische Methoden	55
2.10.1	Proteinbestimmung nach Bradford	55
2.10.2	Chemotaxonomische Untersuchungen	55
2.10.3	Biolog-Assay zur Kohlenstoffverwertung	56
2.10.4	¹³ C-Inkorporations-Experiment.....	57
2.10.5	Eisenkorrosionsexperiment.....	58
2.10.6	HPLC (High-Performance-Liquid-Chromatography)	59
III.	Ergebnisse.....	60
3.1	Isolierung mesophiler Knallgasbakterien	60
3.2	Screening der Isolate im bioelektrochemischen System	62
3.3	Genomsequenzierung des <i>Kyrpidia</i> -Isolates	65
3.4	Artbeschreibung <i>Kyrpidia spormannii</i> EA-1 ^T	69
3.4.1	Morphologische Beschreibung.....	70
3.4.2	Chemotaxonomische Untersuchungen.....	70
3.4.3	Physiologische Untersuchungen	71
3.4.4	<i>Genome-Mining</i>	73
3.5	Mikroskopische Aktivitätsanalyse des kathodischen Biofilms.....	74
3.6	Komparative Transkriptomanalyse	75
3.7	Eisenkorrosionsexperiment	84
3.8	Einfluss von Atmungsketteninhibitoren auf die Stromdichte in einem Elektrosynthesereaktor	87
3.9	Kultivierung von <i>K. spormannii</i> in bedruckbaren Fließzellen	88
3.10	¹³ C-Inkorporationsexperiment	91
3.11	Untersuchungen zur Eignung von Rauchgas als Substrat für das autotrophe Wachstum von <i>K. spormannii</i>	92
IV.	Diskussion	95
4.1	Initiales Screening der Knallgas-Isolate	95
4.2	Artbeschreibung <i>Kyrpidia spormannii</i> EA-1 ^T	99
4.3	Untersuchungen zum EET-Mechanismus von einer Kathode in <i>K. spormannii</i>	101

4.4	Evaluation von PHB als potenzielles Produkt eines mikrobiellen Elektrosyntheseprozesses	107
4.5	Kultivierung von <i>K. spormannii</i> in bedruckbaren Fließzellen	110
4.6	Evaluation der Verwendung von Knallgasbakterien als Biokatalysator in einem mikrobiellen Elektrosyntheseprozess.....	113
4.7	Ausblick.....	115
V.	Referenzen.....	117
VI.	Appendix.....	135
6.1	16S rDNA Sequenz <i>Pseudomonas</i> -Isolat.....	135
6.2	16S rDNA Sequenz <i>Hydrogenophaga</i> -Isolat.....	135
6.3	Dünnschichtchromatographien zur Bestimmung der polaren Lipide von <i>K. tusciae</i> und <i>K. spormannii</i>	136
6.4	Vergleich der Fettsäureprofile von <i>K. spormannii</i> und <i>K. tusciae</i>	136
6.5	Vergleichende Genomanalyse (<i>K. tusciae</i> vs. <i>K. spormannii</i>).....	137
6.6	Phylogenetische Untersuchungen zur [NiFe]-Hydrogenase aus <i>K. spormannii</i>	142
6.7	Absolute Expressionswerte (tpm) des zentralen Kohlenstoffmetabolismus von <i>K. spormannii</i>	145
6.8	Absolute Expression der an der Atmungskette beteiligten Gene.....	146
6.9	Tabellarische Auflistung der c-Typ Cytochrome in <i>K. spormannii</i>	147
6.10	BLAST-Ergebnisse - PplA aus <i>L. monocytogenes</i> gegen das Genom von <i>K. spormannii</i> 148	
6.11	Chronoamperometrische Daten des ¹³ C-Inkorporations-experimentes	149

ZUSAMMENFASSUNG

Bei der sogenannten mikrobiellen Elektrosynthese handelt es sich um eine recht junge Technologie zur direkten Konversion von CO₂ und elektrischem Strom in organische Verbindungen. Kathodische Elektronen dienen dabei elektroautotrophen Mikroorganismen als alleinige Energie- und Elektronenquelle zur CO₂-Fixierung. In der Literatur sind nur wenige Mikroorganismen beschrieben, welche als Biokatalysator in einem mikrobiellen Elektrosyntheseprozess verwendet werden können. Dabei handelt es sich überwiegend um acetogene und methanogene Organismen. Dies resultiert in einer geringen Produktpalette dieser vielversprechenden Technologie. Darüber hinaus handelt es bei der genannten Organismengruppen um strikt anaerobe Mikroorganismen. Allerdings enthalten die Abgasströme großer CO₂-Emissionsquellen typischerweise Sauerstoff, wodurch eine direkte Nutzung dieser Substratströme durch anaerobe, elektroautotrophe Organismen nur durch eine kostspielige Aufreinigung des Substrates erwirkt werden könnte. Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung eines geeigneten Biokatalysators zur Nutzung von CO₂ in einem aeroben, mikrobiellen Elektrosyntheseprozess. Dabei wurden verschiedene, im Rahmen einer Isolationskampagne in Reinkultur gebrachte Knallgasbakterien einem initialen Elektroautotrophie-Screening unterzogen. In diesem Screening konnte ein thermoacidophiles Isolat der Gattung *Kyrpidia* als ein geeigneter Kandidat für den angestrebten Prozess identifiziert werden. Anschließend wurde das Genom von *Kyrpidia* sp. in einem dualen Sequenzierungsansatz als Grundlage weiterer Analysen sequenziert. Anhand genomischer, chemotaxonomischer und physiologischer Untersuchungen konnte das Isolat als eine neue Art der Gattung *Kyrpidia* beschrieben werden. Mikroskopische Analysen eines kathodischen *Kyrpidia spormannii*-Biofilms bestätigten dessen Zellvitalität und Aktivität. Mittels einer vergleichenden Transkriptomanalyse wurden Hinweise auf eine kathodische CO₂-Fixierung über den Calvin-Zyklus, eine elektroautotrophe PHB-Produktion sowie eine hydrogenase-abhängige Elektronenaufnahme von der Kathode erlangt. Durch die Kultivierung von *K. spormannii* in mit Druck beaufschlagbaren, bioelektrochemischen Fließzellen wurden vergleichsweise hohe Biofilmdichten erreicht. Elektroautotrophes Wachstum konnte anhand eines ¹³C-Inkorporationsexperiment und optischer Kohärenztomographie nachgewiesen werden. Abschließend konnte die Nutzung von Rauchgas aus einem Kohlekraftwerk als alleinige Kohlenstoffquelle für das autotrophe Wachstum von *K. spormannii* gezeigt werden. Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit ein neuartiger Biokatalysator für einen aeroben mikrobiellen Elektrosyntheseprozess beschrieben werden.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Einfluss verschiedener Treibhausgase auf die Nettostrahlungsbilanz der Erde.....	2
Abb. 2: Schematische Reaktionsdarstellungen der sechs bekannten CO ₂ -Fixierungswege...	9
Abb. 3: Vereinfachte Darstellung verschiedener Anwendungsbeispiele primärer METs.....	15
Abb. 4: Übersicht über verschiedene Varianten des EETs.	19
Abb. 5 Übersicht über den kathodischen Stromverbrauch verschiedener autotropher Organismen.....	26
Abb. 6: A. Schematische Darstellung des Aufbaus der in dieser Arbeit verwendeten Synthesereaktoren. B. Lichtbildaufnahme der Synthesereaktoren	31
Abb. 7: 3D-Rendering des Fließzellenversuchsaufbaus.	32
Abb. 8: Makro- und mikroskopische Morphologie der beiden mesophilen Isolate.	60
Abb. 9: Bioelektrochemisches Screening der Knallgas-Isolate.	63
Abb. 10: Proteinbestimmung nach Bradford der basisch hydrolysierten, kathodischen Biofilme.	64
Abb. 11: Übersichtsgenomkarte des assemblierten, geschlossenen Genoms.....	66
Abb. 12: Phylogenetische Einordnung des Isolates in den Stammbaum der <i>Alicyclobacillaceae</i> ,.....	67
Abb. 13: Gesamtgenombasierter, phylogenetischer Stammbaum basierend auf den Ergebnissen der GPDP-Analyse.	69
Abb. 14: Venn Diagramm der orthologen und homologen Gencluster von <i>Kyrpidia tusciae</i> und <i>Kyrpidia sp.</i>	69
Abb. 15: Mikroskopische Aufnahmen von <i>K. spormannii</i> EA-1 ^T	70
Abb. 16: Mikroskopische Aktivitätsanalysen des kathodischen Biofilms	75
Abb. 17: Venn-Diagramm der signifikant hochregulierten Gene.....	77
Abb. 18: Hauptkomponentenanalyse des Transkriptomdatensatzes.....	78
Abb. 19: Modell des Kohlenstoffflusses von CO ₂ zu PHB in <i>K. spormannii</i>	79
Abb. 20: Schema und vergleichende Expressionsdaten der Energiekonservierung in <i>K. spormannii</i>	82
Abb. 21: Gemessener Wasserstoffanteil in der Gasphase der mit Eisengranula versetzten Kulturflaschen (in Vol%).	86
Abb. 22: Einfluss verschiedener Atmungsketteninhibitoren auf den Stromverbrauch eines mit <i>K. spormannii</i> inokulierten Elektrosynthesereaktors (-500 mV vs. SHE).....	87
Abb. 23: 3D-Rekonstruktionen der OCT-Datensätze aus unterschiedlichen Fließzellexperimenten.	89

Abb. 24: Phasenkontrast- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der nilrotgefärbten Biofilmprouben aus der mit Potential beaufschlagten Fließzelle.....	90
Abb. 25: Konfokale <i>in situ</i> Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen der Kathode einer mit Druck und Potential beaufschlagten Fließzelle.....	91
Abb. 26: Schematische Übersicht des experimentellen Verlaufes des Kohlenstoffisotopenexperiments zur Bestätigung der kathodischen CO ₂ -Fixierung durch <i>K. spormannii</i>	91
Abb. 27: Kohlenstoffisotopenverhältnisse der Biomasse des kathodischen Biofilms und des Inokulums.	92
Abb. 28: Wachstumskurve des lithoautotrophen Wachstums von <i>K. spormannii</i> auf Rauchgas eines Kohledampfkraftwerkes als alleinige Kohlenstoffquelle.....	93
Abb. 29: Einordnung von <i>K. spormannii</i> in die Übersicht über den kathodischen Stromverbrauch verschiedener autotropher Organismen	97
Abb. 30: Doppeltlogarithmischer Auftrag der Umsatzrate acetatproduzierender, anoxischer Elektrosynthesesysteme gegen die dabei erreichten Stromdichten.....	98
Abb. 31: Übersicht über den Zusammenhang zwischen genomischem GC-Gehalts und optimaler Wachstumstemperatur der in Abbildung 13 aufgeführten Typstämme.....	100
Abb. 32: Schematische Darstellung möglicher Elektronenaufnahmerrouten unter Beteiligung der [NiFe]-Hydrogenase aus <i>K. spormannii</i>	103
Abb. 33: Abhängigkeit der Umsatzrate acetogener mikrobieller Elektrosynthesesysteme von dem dabei verwendeten kathodischen Potential.	116
Abb. 34: 2D-Dünnschichtchromatographien der extrahierten polaren Lipide aus <i>K. spormannii</i> und <i>K. tusciae</i>	136
Abb. 35: Phylogenetischer Stammbaum, basierend auf der Proteinsequenz der kleinen Untereinheit der [NiFe]-Hydrogenase.....	142
Abb. 36: Phylogenetischer Stammbaum, basierend auf der Proteinsequenz der großen Untereinheit der [NiFe]-Hydrogenase.....	143
Abb. 37: Phylogenetischer Stammbaum, basierend auf den 16S rRNA-Genen der Spezies, dessen Hydrogenase-Untereinheiten die höchste Ähnlichkeit zu den Hydrogenase-Untereinheiten aus <i>K. spormannii</i> aufweisen	144
Abb. 38: Modell des Kohlenstoffflusses von CO ₂ zu PHB in <i>K. spormannii</i>	145
Abb. 39: Während der Fließzellkultivierung des ¹³ C-Inkorporationsexperimentes gemessene Stromstärke gegen die Zeit.....	149

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Übersicht über klassische, chemische Prozesse zur stofflichen Nutzung von CO ₂ und deren Reaktionsbedingungen.	4
Tab. 2: Phylogenetische Verbreitung und Sauerstoffsensitivität autotropher CO ₂ -Fixierungswege	6
Tab. 3: In dieser Arbeit in Reinkultur verwendete Stämme.	29
Tab. 4: Grundrezept für einen Liter ES-Medium.	34
Tab. 5: Grundrezept für einen Liter Wolfe's mineral elixir	34
Tab. 6: Grundrezept für einen Liter R2A-Medium.....	35
Tab. 7: Grundrezept für einen Liter modifiziertes R2A-Medium (R2A _M).	35
Tab. 8: Grundrezept für einen Liter <i>Hydrogenophaga</i> -Medium.	35
Tab. 9: Grundrezept für einen Liter Na ₂ HPO ₄ Stammlösung.	36
Tab. 10: Grundrezept für einen Liter KH ₂ PO ₄ Stammlösung.....	36
Tab. 11: Grundrezept für einen Liter NaHCO ₃ Stammlösung.	36
Tab. 12: Grundrezept für einen Liter Spurenelemente.	36
Tab. 13: Grundrezept für einen Liter <i>Methanococcus</i> -Medium.	37
Tab. 14: Grundrezept für einen Liter Methanococcus-Spurenelemente.	37
Tab. 15: Grundrezept für einen Liter Methanococcus-Vitaminlösung.	38
Tab. 16: Grundrezept für einen Liter L-Cystein-Stammlösung.	38
Tab. 17: Grundrezept für einen Liter Na ₂ S-Stammlösung.....	38
Tab. 18: Kultivierungsbedingungen der in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen...	39
Tab. 19: Zur physiologischen Charakterisierung von <i>K. spormannii</i> eingesetzte Medien.	40
Tab. 20: Auflistung der chronoamperometrischen Versuche und der dafür verwendeten bioelektrochemischen Systeme.	41
Tab. 21: Einwaage für 500 ml 10x PBS (<i>phosphate buffered saline</i>).	43
Tab. 22: Grundrezept für 100 ml Fixierungslösung.....	43
Tab. 23: Zusammensetzung der Hybridisierungspuffer mit unterschiedlichen Formamidkonzentrationen (FA) 0, 20 und 35 %.	44
Tab. 24: Komponenten der drei verwendeten Waschpuffer.....	44
Tab. 25: Einwaage für 500 ml 20x SSC.....	44
Tab. 26: Verwendete FISH-Sonde.....	45
Tab. 27: Grundrezept für einen Milliliter Live-Dead-Färbelösung.	47
Tab. 28: In dieser Arbeit verwendete Primer und ihre Sequenz in 5'-3' Richtung.....	48
Tab. 29: Thermocycler-Standard-Programme für analytische und präperative PCR.	49
Tab. 30: Standartansätze für analytische und präperative PCR.....	49

Tab. 31: Grundrezept für einen Liter Elutionspuffer (TE).....	50
Tab. 32: Bestandteile des 50x TAE-Puffers.....	51
Tab. 33: Anzahl der ungefilterten Reads resultierend aus der RNA-Sequenzierung.....	53
Tab. 34: Grundrezept für einen Liter Bradfordreagenz.....	55
Tab. 35: BLAST-Analyse der amplifizierten 16S rRNA-Gensequenzen.....	61
Tab. 36: Statistiken über die Rohdaten der Genomsequenzierungen.....	65
Tab. 37: Ergebnisse der genombasierten, phylogenetischen Untersuchungen.	68
Tab. 38: Zusammenfassung der physiologischen und morphologischen Unterschiede, welche zur Differenzierung der beiden Spezies der Gattung <i>Kyrpidia</i> herangezogen werden können.	72
Tab. 39: <i>Mapping</i> -Statistik der Transkriptomanalyse.	76
Tab. 40: Anzahl exprimierter Gene unter den getesteten Bedingungen.	77
Tab. 41: Zusammenfassung der Expressionsdaten einiger ausgewählter Gene.	84
Tab. 42: Abhängigkeit des Redoxpotentials der Wasserstoffentstehungsreaktion vom Wasserstoffpartialdruck unter den für <i>K. spormannii</i> gewählten Bedingungen.....	104
Tab. 43: Fettsäureprofile von <i>K. spormannii</i> und <i>K. tusciae</i>	136
Tab. 44: Tabellarische Auflistung der in der vergleichenden Genomanalyse gefundenen Gene.....	137
Tab. 45: Auflistung derjenigen Gene, in deren Aminosäuresequenz die <i>c</i> -Typ-Cytochrom- Erkennungssequenz CXXCH gefunden werden konnte.....	147

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Erklärung
AQDS	Anthraquinon-2,6-disulfonat
ATP	Adenosintriphosphat
BES	Bioelektrochemisches System
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
CCU	<i>Carbon Capture and Utilization</i>
DAD	Diodenarraydetektor
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
e ⁻	Elektron
E ⁰	Standard-Redoxpotential
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EET	Extrazellulärer Elektronentransport
ES	Elektrosynthese
et al.	<i>Et alii</i>
EtOH	Ethanol
FA	Formamid
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G	Erdbeschleunigung
H ⁺	Proton
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IPCC	<i>Intergovernmental Panel on Climate Change</i>
KIT	Karlsruher Institut für Technologie
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
MET	Mikrobielle Elektrochemische Technologie
MFC	<i>Microbial Fuel Cell</i>
NAD	Oxydierte Form des Nicotin-Amid-Dinukleotids
NADH	Reduzierte Form des Nicotin-Amid-Dinukleotids
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NDIR	Nichtdispersiver Infrarotsensor
OCP	<i>Open Circuit Potential</i>
OCT	<i>Optical Coherence Tomography</i>
OD	Optische Dichte
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>

PHB	Polyhydroxybuttersäure
RDP	<i>Ribosomal Database Project</i>
RDK	Rheinhafendampfkraftwerk
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Retentionszeit
RuBisCO	Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
SCE	<i>Standard Calomel Electrode</i>
SHE	<i>Standard Hydrogen Electrode</i>
TIC	<i>Total Inorganic Carbon</i>
TMAO	Trimethylaminoxid
TYGS	<i>Type strain genome server</i>
Vol%	Volumenprozent
vs.	versus
z.B.	Zum Beispiel

I. EINLEITUNG

Einen Monat nach dem Beginn der hier dargelegten Forschungsarbeiten, am 12. Dezember 2015, wurde das sogenannte Übereinkommen von Paris (*Paris Agreement*) auf einer UN-Klimakonferenz in Le Bourget verabschiedet (FCCC, 2015). Das Abkommen sieht eine Limitierung des globalen Mitteltemperaturanstiegs von deutlich unter 2 °C gegenüber dem vorindustriellen Niveau vor, um hierdurch die Folgen und Risiken des anthropogenen Klimawandels beträchtlich zu mildern (IPCC, 2014). Das Übereinkommen wurde von allen UN-Mitgliedsstaaten unterzeichnet und bereits von 185 Staaten ratifiziert („United Nations Treaty Collection“, 2019). Dessen ungeachtet stiegen die jährlichen, globalen Treibhausgasemissionen seit 2015 weiterhin stetig an (Andrews *et al.*, 2014; Butler & Montzka, 2019; Olhoff & Christensen, 2019). Neben einem dringenden Handlungsbedarf in Politik und Wirtschaft bedarf es deshalb intensiver Forschung zur Entwicklung neuartiger, nachhaltiger Technologien zur Reduktion von Treibhausgasemissionen, um das „Zwei-Grad-Ziel“ dennoch zu erreichen (Olhoff & Christensen, 2019).

1.1 Kohlenstoffdioxid als Treibhausgas

Das bedeutendste anthropogene Treibhausgas ist Kohlenstoffdioxid, welches derzeit mit einem Strahlungsantrieb von $2,04 \text{ W m}^{-2}$ für über 65 % des Bruttostrahlungsantriebs aller langlebigen Treibhausgase verantwortlich ist (Siehe Abb. 1)(Andrews *et al.*, 2014; Butler & Montzka, 2019). Die Konzentration von CO_2 in der Erdatmosphäre ist seit 1750 um mehr als 40 % gestiegen und befindet sich damit auf einem Höchstwert innerhalb der letzten 800.000 Jahre (IPCC, 2013). Laut IPCC ist dieser Anstieg auf einen „beispiellosen“ menschlichen Einfluss auf den natürlichen Kohlenstoffkreislauf zurückzuführen. Im gegenwärtigen Zeitabschnitt der Erdgeschichte, dem Holozän, befand sich dieser globale Stoffkreislauf in einem annähernden Gleichgewicht (Ciais *et al.*, 2013). Erst die industrielle Verwendung fossiler Rohstoffe und die daraus resultierende Freisetzung langfristig gespeicherter Kohlenstoffvorkommen sowie eine intensive Landnutzung ließen die atmosphärische CO_2 -Konzentration seit Beginn des Industriezeitalters auf über 400 ppm ansteigen (IPCC, 2013). Eine Reduktion der momentanen, atmosphärischen Kohlenstoffdioxidkonzentration auf vorindustrielles Niveau durch rein natürliche Prozesse würde mehrere 100.000 Jahre in Anspruch nehmen (Ciais *et al.*, 2013).

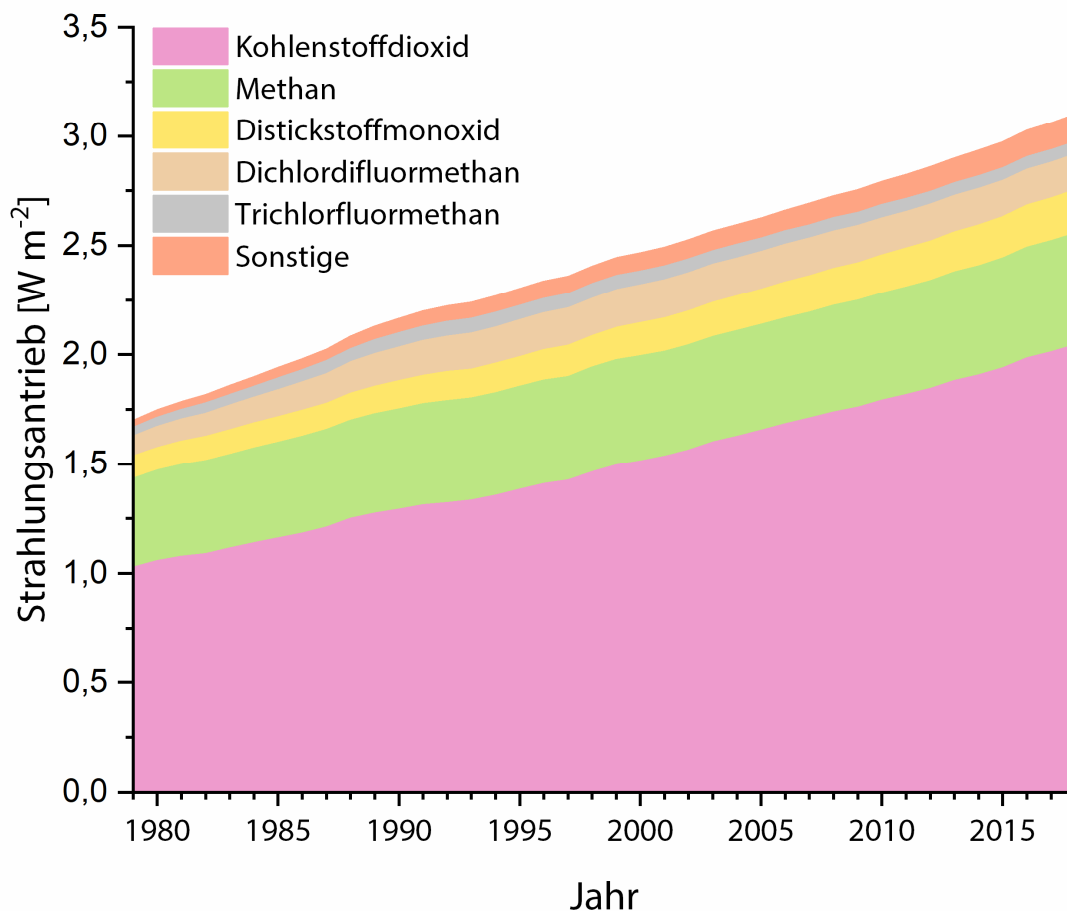


Abb. 1: Einfluss verschiedener Treibhausgase auf die Nettostrahlungsbilanz der Erde. Der sogenannte Strahlungsantrieb (W m^{-2}) ist ein vom IPCC eingeführtes Maß, um Änderungen in der Energiebilanz und somit dem Klimasystem der Erde durch natürliche oder anthropogene Einflussfaktoren zu beschreiben. Ein positiver Strahlungsantrieb (W m^{-2}) resultiert in einer Klimaerwärmung, da in diesem Fall die Erde mehr Energie (J) pro Zeit (t) - ($\text{J s}^{-1} = \text{W}$) - und Fläche (m^2) von der Sonne aufnimmt, als sie in Form von Strahlung wieder abgeben kann (nach Butler & Montzka, 2019).

Um die atmosphärische CO_2 -Konzentration dennoch langfristig zu senken und somit die Folgen des Klimawandels zu limitieren, wird häufig die Etablierung eines sogenannten technischen Kohlenstoffkreislaufs postuliert (European Commission, 2015; Koch *et al.*, 2016; Schlögl *et al.*, 2018). Hierfür soll im Rahmen einer nachhaltigen Kreislaufwirtschaft auf eine zirkuläre Wertschöpfung des Rohstoffs Kohlenstoff gesetzt werden, um so fossile Rohstoffe zu substituieren und positive Netto- CO_2 -Emissionen zu vermeiden. Eine stoffliche Nutzung des derzeitigen Abfallstroms CO_2 stellt hierbei die Schlüsseltechnologie zur Zirkularisierung des technischen Kohlenstoffkreislaufs dar. So soll Kohlenstoffdioxid sowohl als Rohstoff für die Speicherung erneuerbarer Energien in Form von Methan oder flüssigen Energieträgern, als auch als nachhaltige Kohlenstoffquelle für die Produktion von z.B. Plattformchemikalien oder Kunststoffen dienen. Lange galt eine Nutzung von Kohlenstoffdioxid als Rohstoff als unwirtschaftlich und war daher aus ökonomischer Sicht nur von geringem Interesse

(Fischedick *et al.*, 2015; Koch *et al.*, 2016). Daher besteht die Rohstoffbasis der chemischen Industrie zur Produktion von Treibstoffen und Basischemikalien derzeit zu weit über 80 % aus fossilen Kohlenstoffverbindungen (Benzing, 2019). Erst durch die weitläufige Akzeptanz des anthropogenen Ursprungs des derzeitigen Klimawandels, sowie durch die Limitierung der fossilen Ressourcen mit ihren sozialen und ökonomischen Konsequenzen, wurde die stoffliche Nutzung von CO₂ durch sogenannte CCU-Technologien (*Carbon Capture and Utilization*) verstärkt in den gesellschaftlichen und wissenschaftlichen Fokus gerückt (Fischedick *et al.*, 2015; Koch *et al.*, 2016; Palanivelu, 2017; Schlögl *et al.*, 2018).

1.2 Stoffliche Nutzung von Kohlenstoffdioxid

Kohlenstoffdioxid ist ein nahezu ubiquitär verfügbarer und ein verhältnismäßig günstiger Rohstoff. Es stellt die am höchsten oxidierte, stabile Form des Kohlenstoffs dar. Aus thermodynamischer Sicht handelt es sich somit um ein äußerst reaktionsträges Molekül mit einer Standardbildungsenthalpie (ΔH_f°) von -394 kJ mol^{-1} (North, 2014). Bedingt durch diese Eigenschaft ist die Reduktion von CO₂ zu nutzbaren, höherwertigen Kohlenstoffverbindungen stets von einem Energieeintrag abhängig. Dieser kann zum Beispiel durch extreme Reaktionsbedingungen, energiereiche Reaktionspartner, elektrischen Strom oder auch Licht erfolgen. Darüber hinaus weisen klassische, chemische CO₂-Konversionsreaktionen häufig hohe Aktivierungsenergien auf, wodurch der Einsatz spezifischer Katalysatoren notwendig wird. Während die Entwicklung photo- und elektrochemischer CCU-Technologien noch vor „ungelösten Herausforderungen“ steht, sind Prozesse, die auf eine konventionelle CO₂-Reduktion durch energiereiche Verbindungen setzen, bereits seit Beginn des 20. Jahrhunderts bekannt (Siehe Tab. 1) (Koch *et al.*, 2016). Diese Reaktionen setzten häufig auf Wasserstoff als Energieträger. Klassische Verfahren sind zum Beispiel die Methanisierung nach Sabatier, die direkte Methanolsynthese oder die Synthesegasproduktion mittels umgekehrter Wassergas-*Shift*-Reaktion (Rachow, 2017; Wang *et al.*, 2011; Wilhelm, 2016). Sollen bei diesen Technologien positive Netto-CO₂-Emissionen vermieden werden, muss der verwendete Wasserstoff aus regenerativen Quellen stammen. Derzeit stammt jedoch über 90 % der globalen Wasserstoffproduktion aus fossilen Brennstoffen. Eine nachhaltige Wasserstoffherstellung mittels konventioneller Elektrolyseure ist derzeit noch durch geringe Wirkungsgrade und hohe Kosten der Edelmetallkatalysatoren gekennzeichnet (Muradov & Veziroglu, 2005). Die Synthese längererkettiger organischer Produkte, wie z.B. Alkane, Alkene oder Alkohole, kann mit Hilfe der sogenannten Fischer-Tropsch-Synthese realisiert werden. Es handelt sich dabei um einen auf Synthesegas basierenden, mehrstufigen Prozess, dessen Produktspektrum

über unterschiedliche Reaktionsdrücke und -temperaturen gesteuert werden kann. Die geringe Selektivität dieser Reaktion stellt hohe Anforderungen an die Auftrennung und Aufreinigung des Produktgemisches (Kelly, 2018). Eine weitere Produktionsroute - ausgehend von Synthesegas - ist die Methanolsynthese im Nieder- oder Mitteldruck-Verfahren.

Tab. 1: Übersicht über klassische, chemische Prozesse zur stofflichen Nutzung von CO₂ und deren Reaktionsbedingungen.
p - Reaktionsdruckbereich, T - Reaktionstemperaturbereich.

Prozess	p,T	Katalysatoren	Quellen
CO₂ + H₂			
Methanisierung nach Sabatier $\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O}$	300-400 °C 1-10 bar	Ni, Ru, Co	(Rachow, 2017)
Direkte Methanolsynthese $\text{CO}_2 + 3\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$	200-300 °C 50-100 bar	Cu, Zn, Al	(Wang <i>et al.</i> , 2011)
Umgekehrte Wassergas-Shift-Reaktion (Synthesegasproduktion) $\text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CO} + \text{H}_2\text{O}$	550-900 °C 1-30 bar	Cu, Ni, Pt, Rh	(Wilhelm, 2016)
Aus Synthesegas			
Fischer-Tropsch-Synthese $n\text{CO} + m\text{H}_2 \rightarrow \text{Alkan, Alken, Alkohol}$	160-350 °C 0-40 bar	Co, Fe, Ni, Ru	(Kelly, 2018)
Niederdruck-Methanolsynthese $\text{CO} + 2\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{OH}$	200-300 °C 50-100 bar	Cu, Zn, Al	(Koch <i>et al.</i> , 2016)
Mitteldruck-Methanolsynthese $\text{CO} + 2\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{OH}$	220-300 °C 100-300 bar	Cu, Zn, Al, Cr	(Koch <i>et al.</i> , 2016)
Sonstige			
Harnstoffsynthese $\text{CO}_2 + 2\text{NH}_3 \rightarrow \text{H}_2\text{NCONH}_2 + \text{H}_2\text{O}$	170-220 °C 125-250 bar	-	(Meessen, 2010)
Polycarbonate/Polyole $n\text{CO}_2 + m\text{Epoxid} \rightarrow \text{Polycarbonat/Polyol}$	20-80 °C 1-55 bar	Zn, Nd, Y, Porphyrin- und Salen-Komplexe	(Kember <i>et al.</i> , 2011; Qin <i>et al.</i> , 2015)

Als ein Wasserstoff unabhängiges Verfahren, findet die Synthese von Polycarbonaten oder Polyolen durch die Reaktion von Kohlenstoffdioxid mit Epoxiden bereits industrielle Anwendung. Diese Polymere bestehen jedoch nur zu einem geringen Teil von ca. 20 % aus Kohlenstoffdioxid, da die verwendeten Epoxide und sowie weitere Reaktionspartner derzeit noch petrochemisch synthetisiert werden müssen (Covestro, 2019; Koch *et al.*, 2016; Qin *et al.*, 2015). Obwohl die Harnstoffsynthese aus Ammoniak und Kohlenstoffdioxid häufig zu den CCU-Technologien gezählt wird und derzeit die größte stoffliche Nutzung von CO₂ darstellt, weist dieser Prozess keinen Netto-CO₂-Verbrauch auf, da bei der vorangestellten Ammoniaksynthese große Mengen an CO₂ anfallen (Koch *et al.*, 2016; Meessen, 2010).

Ein entscheidender Nachteil der vorbezeichneten CCU-Technologien ist der notwendige hohe Energieeintrag in Form von Druck und Wärme, um die jeweiligen, optimalen Prozessbedingungen (siehe Tab. 1) aufrecht zu halten. Des Weiteren setzen die genannten Verfahren auf hochwertige und empfindliche Katalysatoren, welche dennoch eine oftmals geringe Selektivität aufweisen. Um Vergiftungen der Katalysatoren zu vermeiden, werden darüber hinaus äußerst hohe Anforderungen an den Reinheitsgrad der Edukte gestellt, was wiederum eine kostspielige Aufreinigung typischer CO₂-Abgasströme erfordert (Fischedick *et al.*, 2015). Diese Nachteile haben dazu geführt, dass in den letzten Dekaden biotechnologische Verfahren zur stofflichen Nutzung von CO₂ als nachhaltige Alternative zu klassischen CO₂-Konversionstechnologien stark in den wissenschaftlichen und gesellschaftlichen Fokus gerückt sind. Im Folgenden soll daher auf die Nutzung von CO₂ in der Biotechnologie eingegangen werden (Butler & Lovley, 2016; Fischedick *et al.*, 2015; Simakov, 2017).

1.3 Autotrophe Mikroorganismen in der Biotechnologie

Die Biotechnologie beschäftigt sich mit biologisch katalysierten Prozessen, die einer industriellen Anwendung zugeführt werden könnten. Die Katalysatoren können dabei entweder ganze lebende Zellen oder auch zellfreie Enzyme oder Enzymmischungen sein (Ulber & Soye, 2004). Als Vorteil gegenüber chemischen Katalysen kann zum einen die hohe Spezifität von Enzymen genannt werden, welche oftmals regio- und stereoselektive Reaktionen katalysieren (Rosenbaum & Henrich, 2014). Dies kann insbesondere für die Produktion von Bulk-, Feinchemikalien oder Pharmaka von großem Interesse sein. Zum anderen müssen biotechnologische Prozesse unter physiologischen Bedingungen ablaufen und weisen somit meist deutlich mildere Reaktionsbedingungen auf als chemische Katalysen (Rabaey *et al.*, 2011). Es ist anzumerken, dass es sich (nach streng chemischer Definition) bei lebendigen Organismen nicht um klassische Katalysatoren handelt, da die Organismen einen Teil der Energie der katalysierten Reaktion für Zellerhalt und -wachstum beanspruchen. Dies kann jedoch auch als ein entscheidender Vorteil lebendiger Zellen (Mikroorganismen, Pflanzen oder Zellkulturen) gegenüber freien Enzymen und klassischen Katalysatoren aufgeführt werden, da es sich hiermit bei lebenden Zellen um selbsterhaltende und -regenerierende Katalysatoren handelt.

Die Grundvoraussetzung, die ein Organismus aufweisen muss, um als potenzieller Biokatalysator in einen möglichst effizienten, biotechnologischen CCU-Prozess zu dienen, ist die Fähigkeit zur Nutzung von CO₂ als alleinige Kohlenstoffquelle. Diese physiologische

Eigenschaft, sämtliche organischen Biosynthesen aus anorganischen Stoffen aufzubauen, wird als Autotrophie (*alt. Gr.: αὐτός - selbst; τροφή - Ernährung*) bezeichnet und ist in allen drei Domänen des Lebens (Bacteria, Archaea und Eukarya) beschrieben. Während Autotrophie unter Mikroorganismen weitverbreitet ist, stellen Pflanzen und Algen die einzigen Vertreter der Eukarya mit dieser Eigenschaft dar. Allerdings würde – bedingt durch die Limitierung der globalen, landwirtschaftlichen Nutzflächen - eine intensive stoffliche Nutzung von CO₂ durch Landpflanzen zu einer Flächenkonkurrenz mit der Lebensmittelproduktion führen. Der hierdurch resultierende Preisanstieg von Grundnahrungsmitteln hätte nicht nur schwerwiegende sozioökonomische Folgen, sondern wäre auch aus ethischer Sicht strittig (Fischedick *et al.*, 2015).

1.3.1 CO₂-Fixierungswege

Zu diesem Zeitpunkt sind sechs biologische Stoffwechselwege zur Fixierung von Kohlenstoffdioxid bekannt (siehe Tab. 2), jedoch wird die Existenz weiterer CO₂-Fixierungswege angenommen (Fuchs, 2011).

Tab. 2: Phylogenetische Verbreitung und Sauerstoffsensitivität autotropher CO₂-Fixierungswege (Berg *et al.*, 2010; Fuchs, 2011; Fuchs *et al.*, 2017).

CO ₂ -Fixierungsweg	Vorkommen	O ₂ -Empfindlichkeit	Carboxylasen
Calvin-Zyklus (<i>Calvin-Benson-Bassham-Zyklus</i>)	Cyanobacteria, in den meisten aeroben oder fakultativ aeroben Eubacteria	-	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
Reduktiver Acetyl-CoA-Weg (<i>Wood-Ljungdahl-Weg</i>)	Methanogene und sulfatreduzierende Archaea, acetogene Firmicutes, einige Spirochaeten, viele Deltaproteobacteria, Anamox-Bakterien der Planctomyceten	++	Formiat-Dehydrogenase, CO-Dehydrogenase, Pyruvat-Synthase
Reduktiver Citratzyklus (<i>Arnon-Buchanan-Zyklus</i>)	Chlorobiales, Aquificales, Epsilonproteobacteria, wenige Alpha- und Deltaproteobacteria, Nitrospirae	+++	Pyruvat-Synthase, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, 2-Oxoglutarat-Synthase, Isocitrat-Dehydrogenase
Dicarboxylat/ 4-Hydroxybutyratzyklus	Anaerobe Thermoproteales, Desulfurococcales (Crenarchaeota)	++	Pyruvat-Synthase, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase
3-Hydroxypropionat/ 4-Hydroxybutyratzyklus	Aerobe Sulfolobales (Crenarchaeota), aerobe Thaumarchaeota	-	Acetyl-CoA-Carboxylase, Propionyl-CoA-Carboxylase
3-Hydroxybutyrat-Bizyklus	Chloroflexaceae	-	Acetyl-CoA-Carboxylase, Propionyl-CoA-Carboxylase

Darüber hinaus wird intensiv an der Entwicklung neuartiger, synthetischer CO₂-Fixierungswege geforscht. So konnten Schwander *et al.* erstmals die Funktionalität eines

synthetischen CO₂-Fixierungsweges *in vitro* nachweisen (Schwander *et al.*, 2016). Die funktionale Expression dieses Zyklus *in vivo* stellt jedoch auf Grund der 17 beteiligten Enzyme eine große Herausforderung dar. Im Folgenden soll daher lediglich auf natürliche CO₂-Fixierungswege eingegangen werden, welche sich neben den beteiligten Enzymen und deren Substraten vorrangig durch unterschiedliche Sauerstoffsensitivitäten und ihre phylogenetische Verbreitung unterscheiden (Fuchs *et al.*, 2017).

1.3.1.1 Calvin-Zyklus

Der Calvin-Benson-Bassham-Zyklus (Calvin-Zyklus) ist der aus quantitativer Sicht wichtigste CO₂-Fixierungsweg der Erde. Über 90 % des global assimilierten, anorganischen Kohlenstoffs wird mit Hilfe dieses Stoffwechselwegs fixiert (Erb & Zarzycki, 2018). Alle autotrophen Eukaryoten, sowie einige autotrophe Archaea und die meisten aeroben, autotrophen Bacteria, assimilieren Kohlenstoffdioxid mit Hilfe des Calvin-Zyklus. Die weite phylogenetische Verbreitung dieses Stoffwechselweges wird auf dessen hohe Sauerstofftoleranz sowie eine vergleichsweise effiziente Entkopplung der CO₂-Fixierung und des zentralen Kohlenstoffmetabolismus zurückgeführt (Berg, 2011). In allen zyklischen CO₂-Fixierungswegen wird CO₂ (oder HCO₃⁻) mit Hilfe spezifischer Enzyme (Carboxylasen) in Form einer Carboxylgruppe kovalent an ein organisches Akzeptormolekül gebunden. Der so fixierte Kohlenstoff kann danach in organischer Form dem Stoffwechselweg entnommen und für zelluläre Synthesen genutzt werden. Durch eine anschließende Regenerierung des Akzeptormoleküls wird der Zyklus geschlossen (Bar-Even *et al.*, 2012; Fuchs *et al.*, 2017). Bei der sogenannten RuBisCO (*Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase*) handelt es sich um die einzige Carboxylase des Calvin-Zyklus. Dieses Schlüsselenzym katalysiert die elektrophile Addition von CO₂ an die reaktive Endiolatform von Ribulose-1,5-bisphosphat (Fuchs *et al.*, 2017). Hierbei entsteht ein instabiles C₆-Intermediat, welches anschließend in zwei Moleküle 3-Phosphoglycerat zerfällt. Die weiteren vier Reaktionsschritte entsprechen formal der Gluconeogenese bis hin zu Fructose-6-phosphat. Anschließend wird über den reduktiven Teil des Pentosephosphatweges (hauptsächlich unter der Beteiligung der Enzyme Transaldolase und Transketolase) die C₅-Verbindung Ribulose-5-Phosphat zurückgebildet (siehe Abb. 2A). In einem letzten Schritt phosphoryliert das zweite Schlüsselenzym des Zyklus, die sogenannte Ribulose-5-Phosphat-Kinase, Ribulose-5-Phosphat unter ATP-Verbrauch und katalysiert damit die Synthese des ursprünglichen CO₂-Akzeptormoleküls Ribulose-1,5-Bisphosphat. Ungeachtet der bereits genannten Sauerstofftoleranz des Calvin-Zyklus, zeigt die RuBisCO eine Oxygenase-Nebenaktivität. Hierbei wird durch die Oxygenierung des Substrates Ribulose-1,5-Bisphosphat ein Peroxid gebildet, welches zu 3-Phosphoglycerat und

2-Phosphoglycolat dissoziiert (Fuchs *et al.*, 2017). Da das toxische 2-Phosphoglycolat essenzielle Stoffwechsellzyme, wie zum Beispiel die Phosphofruktokinase oder die Triosephosphat-Isomerase, inhibiert, muss 2-Phosphoglycolat in der Zelle unter Energieverbrauch abgebaut werden. Der geschätzte Kohlenstoffverlust durch die Oxygenase-Aktivität der RuBisCO beträgt circa 20 % (Erb & Zarzycki, 2018). Die Substratselektivität - gegenüber CO₂ - verhält sich dabei negativ reziprok zur Wechselzahl des Enzyms. Anhand vergleichender metagenomischer Analysen konnten drei unterschiedliche Formen der RuBisCO identifiziert werden (Typ I, II und III). Lediglich Typ I und Typ II werden von autotrophen Organismen zur CO₂-Fixierung genutzt. Typ III ist nur in bestimmten Archaea zu finden und ist dort vermutlich an einem alternativen Stoffwechselweg zum Aufbau von Ribonukleosiden beteiligt (Erb & Zarzycki, 2018). Während Typ I-Enzymkomplexe aus jeweils acht großen und acht kleinen Untereinheiten aufgebaut sind, bestehen Enzymkomplexe des Typ II lediglich aus großen Untereinheiten. Interessanterweise zeigen RuBisCOs des Typ I eine geringere Sauerstoffaffinität als die im Gegensatz dazu schnelleren Enzyme des Typ II.

1.3.1.2 Wood-Ljungdahl-Weg

Beim reduktiven Acetyl-CoA-Weg (Wood-Ljungdahl-Weg) handelt es sich um den einzig bekannten nicht zirkulären CO₂-Fixierungsweg. Dieser ursprüngliche Stoffwechselweg ist in vielen strikt anaeroben Mikroorganismen, wie zum Beispiel den methanogenen Archaea, den acetogenen Bacteria und einigen sulfatreduzierenden oder eisenreduzierenden Bakterien zu finden (Fuchs, 2011). Dabei wurden bereits viele unterschiedliche Varianten dieses Stoffwechselweges beschrieben, die sich vor allem durch die beteiligten Cofaktoren unterscheiden. Darüber hinaus ist dieser Stoffwechselweg in acetogenen und methanogenen Mikroorganismen Teil einer anaeroben Atmung (Fuchs *et al.*, 2017). Kohlenstoffdioxid fungiert dabei als terminaler Elektronenakzeptor, dessen Reduktion mit Hilfe von Wasserstoff als Elektronendonator direkt oder indirekt an die Energiekonservierung in Form eines Protonen- oder Natriumionen-Gradienten gekoppelt ist. Zwei Moleküle CO₂ werden in diesem CO₂-Fixierungsweg zu einem Molekül Acetyl-CoA reduziert (Berg, 2011). Die beiden Kohlenstoffdioxidmoleküle durchlaufen dabei unterschiedliche Reduktionsreaktionen und werden in einem finalen Schritt in Form eines Methyl- und eines Carbonyl-Restes durch das sauerstoffsensitive Schlüsselenzym Acetyl-CoA-Synthase kondensiert (siehe Abb. 2B). Aus diesem Grund wird der Stoffwechselweg in zwei Zweige gegliedert. Man unterscheidet dabei zwischen dem Carbonyl-Zweig (*Western branch*) und dem sogenannten Methyl-Zweig (*Eastern branch*) (Ragsdale, 1997). Für die Reduktion von Kohlenstoffdioxid zu einer Methylgruppe im Methyl-Zweig wird zunächst ein Molekül CO₂

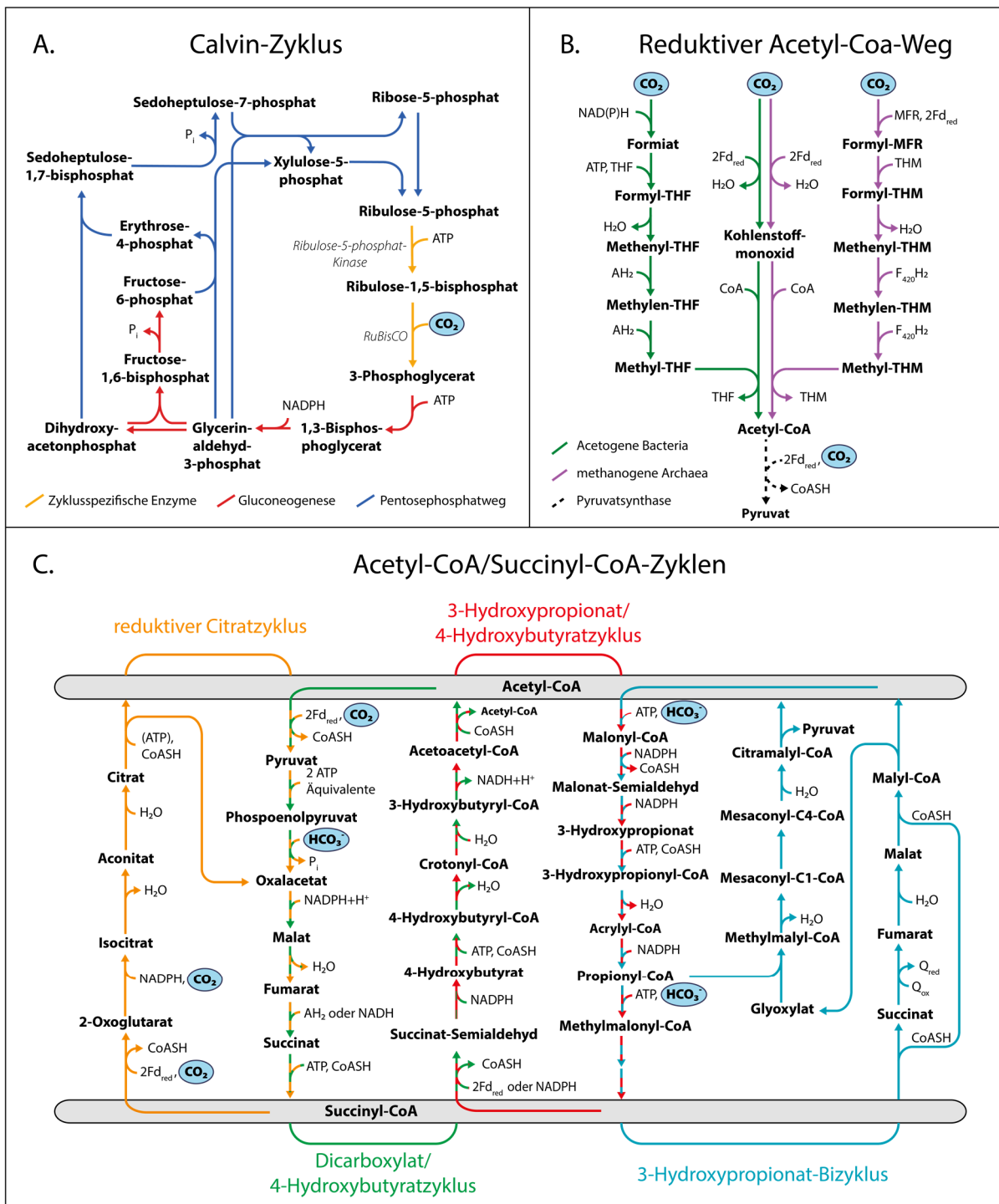


Abb. 2: Schematische Reaktionsdarstellungen der sechs bekannten CO₂-Fixierungswege. Verändert nach Fuchs und Bar-Even (Bar-Even et al., 2012; Fuchs et al., 2017). Fd – Ferredoxin; red. - reduziert; ox. oxidiert; Q – Quinon; AH – reduzierter Elektronendonator; THF – Tetrahydrofolsäure; MFR – Methanofuran; THM – Tetrahydromethanopterin.

in Form eines Formyl-Restes an einen Cofaktor gebunden: Tetrahydrofolat (THF) in Bacteria und Tetrahydromethanopterin (THM) in Archaea. Während in Vertretern der Bacteria Kohlenstoffdioxid zuvor von einer Formiatdehydrogenase zu Formiat reduziert wird und anschließend unter ATP-Verbrauch an THF gebunden wird, wird das zu reduzierende CO₂-Molekül in Archaea unter Zuhilfenahme von reduziertem Ferredoxin zunächst reduktiv

an einen weiteren Cofaktor (Methanofuran) gebunden und dann auf THM übertragen. Die Cofaktor-gebundene Formylgruppe wird sowohl in Bacteria als auch in Archaea in weiteren Reduktionsreaktionen zu einer Cofaktor-gebundenen Methylgruppe reduziert. Im Carbonyl-Zweig wird das zweite CO₂-Molekül zu Kohlenstoffmonoxid, gebunden an ein Nickelatom im aktiven Zentrum einer Kohlenstoffmonoxid-Dehydrogenase, reduziert. Diese CO-Dehydrogenase ist Teil des sogenannten Acetyl-CoA-Synthase-Komplexes. Dieser Komplex überträgt die Methylgruppe aus dem Methylzweig auf die Nickel-gebundene Kohlenstoffmonoxid-Gruppe, wobei ein enzymgebundenes Molekül Acetat gebildet wird. Im letzten Schritt wird das Acetatmolekül vom Nickelzentrum auf Coenzym A übertragen, wodurch das Endprodukt des Stoffwechselweges, Acetyl-CoA, gebildet wird (Berg, 2011; Fuchs *et al.*, 2017). Bei der Umsetzung von Acetyl-CoA durch die Pyruvat-Synthase kann ein weiteres Molekül CO₂ fixiert werden. Bedingt durch den geringen ATP-Verbrauch pro assimiliertem Pyruvat-Molekül kann der Wood-Ljungdahl-Weg aus thermodynamischer Sicht als effizientester CO₂-Fixierungsweg gesehen werden (Bar-Even *et al.*, 2012; Berg, 2011). Wie bereits erwähnt, ist dieser Stoffwechselweg jedoch auch Teil der anaeroben Atmung methanogener und acetogener Organismen. Die Energieausbeute dieser anaeroben CO₂-Atmung ist so gering, dass diese Wachstumsform häufig als „Leben am thermodynamischen Limit“ bezeichnet wird (Schuchmann & Müller, 2014). Dies hat einen sehr hohen katabolen Stoffumsatz zur Folge, wodurch nur ein geringer Teil des reduzierten Kohlenstoffs tatsächlich in Form von Pyruvat für zelluläre Synthese verwendet werden kann: In methanogenen Organismen muss zum Aufbau eines Natriumionengradienten zur ATP-Synthese die an THM gebundene Methylgruppe durch eine Methyltransferase auf einen weiteren Cofaktor (Coenzym M) übertragen werden und kann somit nicht mehr von der Acetyl-CoA-Synthase genutzt werden. Die bei dieser exergonen Reaktion „freiwerdende“ Energie kann durch die Methyltransferase in Form eines Natriumionengradienten konserviert werden. Um das nun methylierte Coenzym M wieder zu regenerieren, muss die Methylgruppe zu freiem Methan reduziert werden. Diese Reaktion wird in wasserstoffoxidierenden Methanogenen durch einen elektronenbifurkierenden Heterodisulfidreduktase-Komplex katalysiert (Fuchs *et al.*, 2017). Dabei wird Wasserstoff oxidiert und reduziertes Ferredoxin generiert. Bei der sogenannten Flavin-basierten Elektronenbifurkation handelt es sich um einen kürzlich entdeckten Mechanismus bei welchem zwei Elektronen mit gleichem Redoxpotential eines Elektronendonors (z.B. H₂ oder NAD(P)H) energetisch „disproportioniert“ werden, sodass dabei ein Elektron auf ein höheres und das andere auf ein niedrigeres (energiereicheres) Redoxpotential als das des ursprünglichen Elektronenpaares gebracht werden kann (Buckel & Thauer, 2018). Hierdurch ist der letzte Schritt der Methanogenese mit dem ersten, Ferredoxin-abhängigen Schritt

verbunden. Acetogene Organismen hingegen besitzen keine Methyltransferase und müssen daher andere Mechanismen zur Energiekonservierung nutzen (Schuchmann & Müller, 2014). So sind diese Organismen auf eine elektronenbifurkierende Hydrogenase angewiesen, welche in einem ersten Schritt NAD und Ferredoxin zu reduziertem Ferredoxin und NADH reduziert. Das reduzierte Ferredoxin kann anschließend von einem ionenpumpenden Membrankomplex oxidiert werden. Dabei werden die Elektronen organismenabhängig entweder auf Protonen (Ech-Komplex) oder auf NAD (Rnf-Komplex) übertragen, wodurch Wasserstoff, bzw. NADH generiert wird. Die in beiden Reaktionen anfallenden NADH-Moleküle werden bei der Reduktion der Formylgruppe im Methyl-Zweig regeneriert. Mit Hilfe des durch den Rnf- oder Ech-Komplex generierten Ionengradienten, werden pro Mol synthetisierten Acetyl-CoA zwischen 0,13 mol und 0,63 mol ATP generiert. Da in acetogenen Organismen jedoch während der Synthese eines Moleküls Acetyl-CoA aus CO₂ ein ATP im Carbonyl-Zweig verbraucht wird, hat die Acetyl-CoA-Synthese eine negative ATP-Bilanz und kann somit nicht zur Energiekonservierung genutzt werden. Um dennoch eine positive ATP-Nettoausbeute zu erzielen, muss das gebildete Acetyl-CoA in einer Substratketten-Phosphorylierungs-Reaktion unter Gewinn eines ATPs zu Acetat umgewandelt und aus der Zelle ausgeschieden werden (Bar-Even *et al.*, 2012; Schuchmann & Müller, 2014). Somit können Organismen, welche den Wood-Ljungahl-Weg auch zur Energiekonservierung nutzen, trotz der hohen Effizienz dieses Weges – nur einen geringen Teil des assimilierten CO₂ auch für tatsächliche zelluläre Synthesen nutzen.

1.3.1.3 Acetyl-CoA/Succinyl-CoA-Wege

Die weiteren vier bekannten CO₂-Fixierungswege sind allesamt zyklische Stoffwechselwege, denen die Intermediate Acetyl-CoA und Succinyl-CoA gemeinsam sind (siehe Abb. 2C) (Bar-Even *et al.*, 2012). Auf diese Stoffwechselwege soll an dieser Stelle jedoch nur kurz eingegangen werden: Die phylogenetisch verbreitetste Variante dieser CO₂-Fixierungswege stellt der sogenannte Reduktive Citratzyklus dar. Er ist vor allem in anaeroben und mikroaeroben Bacteria zu finden und für die Bildung eines Moleküls Acetat aus zwei CO₂-Molekülen verantwortlich (Fuchs *et al.*, 2017). Dieser Stoffwechselweg stellt die umgekehrte Form des oxidativen Citratzyklus (Krebszyklus) dar. Die Irreversibilität zweier Schritte des oxidativen Citratzyklus erfordert jedoch mindestens zwei zusätzliche Enzyme, um den Zyklus umzukehren und dabei CO₂ zu fixieren. Hierfür wird die NAD-abhängige 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase durch eine Ferredoxin-abhängige 2-Oxoglutarat-Synthase ersetzt. Des Weiteren wird die Succinat-Dehydrogenase durch eine Fumarat-Reduktase ersetzt. Vor Kurzem konnte gezeigt werden, dass die bisher für irreversibel gehaltene Reaktion der Citrat-Synthase in *Desulfurella acetivorans* reversibel ist (Mall *et al.*, 2018).

Dennoch wird die Spaltung von Citrat zu Acetyl-CoA und Oxalacetat in einigen Organismen durch ein zusätzliches Enzym, der ATP-Citrat-Lyase, katalysiert. Das dabei gebildete Molekül Acetyl-CoA kann mit Hilfe zweier Carboxylierungsreaktionen durch die Pyruvat-Synthase und die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase weiter zum Ausgangsprodukt des reduktiven Citratzyklus, Oxalacetat, umgewandelt werden (Fuchs *et al.*, 2017).

Ungeachtet der potenziellen ökologischen Bedeutung sind die übrigen CO₂-Fixierungswege von einer geringen phylogenetischen Verbreitung und einem bisher nur geringen biotechnologischen Interesse gekennzeichnet (Berg, 2011; Fishedick *et al.*, 2015). Ihnen ist die Bildung von Succinyl-CoA aus Acetyl-CoA und der anschließenden Rückbildung von Succinyl-CoA zu Acetyl-CoA gemeinsam. Bei dieser Regenerierung wird der fixierte Kohlenstoff in organischer Form als Glyoxylat oder Acetyl-CoA freigesetzt. Während der 3-Hydroxypropionat-Bizyklus in Grünen Nicht-Schwefelbakterien gefunden werden kann, werden die beiden 4-Hydroxybutyratzyklen ausschließlich von Crenarchaeota und Thaumarchaeota zur Kohlenstofffixierung genutzt. Bedingt durch unterschiedliche Sauerstoffsensitivitäten nutzen aerobe Spezies den 3-Hydroxypropionat/4-Hydroxybutyratzyklus und anaerobe Vertreter den Dicarboxylat/4-Hydroxybutyratzyklus (Bar-Even *et al.*, 2012; Fuchs *et al.*, 2017).

1.3.2 Formen der Autotrophie

Die Oxidationsstufe zellulären Kohlenstoffs beträgt in etwa 0, wohingegen die Oxidationsstufe des Kohlenstoffatoms in Kohlenstoffdioxid +IV beträgt (Dick, 2014). Entsprechend ist die autotrophe Fixierung von Kohlenstoffdioxid als Teil des Anabolismus stets an den Verbrauch von Reduktionsäquivalenten und Energie gekoppelt. Letztere wird entweder direkt oder indirekt über Nutzung eines Ionengradienten bereitgestellt. Aerobe Organismen verwenden typischerweise NADPH als Elektronendonator zur CO₂-Reduktion, anaerobe Organismen hingegen oft sauerstoffsensitives Ferredoxin (Berg, 2011). Der Energieeintrag zur Synthese der Reduktionsäquivalente und der Generierung einer energetisierten Membran kann dabei aus unterschiedlichen Energiequellen stammen:

Die Kopplung von Lichtenergienutzung mit der Fixierung von Kohlenstoffdioxid wird als Photoautotrophie bezeichnet. Im Laufe der Evolution haben sich unterschiedliche Varianten photosynthetisch aktiver Mikroorganismen entwickelt. Dabei wird zwischen oxygener Photosynthese in Cyanobakterien und unterschiedlichen Varianten der anoxygenen Photosynthese, wie sie zum Beispiel in Purpurbakterien oder Grünen Schwefel- und Nicht-Schwefelbakterien zu finden ist, unterschieden (Fuchs *et al.*, 2017). Alle autotrophen

Eukaryonten sind ebenfalls den photoautotrophen Organismen zugehörig. In den letzten Dekaden wurde der Forschung zur Entwicklung neuer biotechnologischer Technologien zur Nutzung photoautotropher Organismen viel Aufmerksamkeit zuteil. So konnten viele CCU-Technologien, in welchen photoautotrophe Organismen, wie zum Beispiel Algen oder Cyanobakterien, als Biokatalysatoren zur stofflichen CO₂-Nutzung eingesetzt werden, bereits den Schritt vom Labormaßstab hin zu Großanwendungen und Pilotprojekten erreichen (Fischedick *et al.*, 2015; Koch *et al.*, 2016). Die intrinsische Eigenschaft der Lichtabhängigkeit photoautotropher Systeme - und die daraus resultierende Abhängigkeit von Tagessonnenstunden - stellt den wesentlichen Nachteil photoautotropher Organismen dar. Darüber hinaus gestaltet sich die Skalierung geeigneter Bioreaktoren für die biotechnologische Nutzung photoautotropher Organismen aufgrund des großen Oberflächenbedarfs zur Lichtsammlung als äußerst schwierig (Fischedick *et al.*, 2015).

Viele Mikroorganismen können jedoch auch chemische Energie in Form von energiereichen Verbindungen als Energie- und Elektronenquelle für die CO₂-Konversion nutzen. Häufige Elektronendonatoren dieser sogenannten chemoautotrophen Mikroorganismen sind H₂, H₂S, Fe²⁺ und NH₄⁺. Während bei einer biotechnologischen CO₂-Konversion durch hydrogenotrophe (wasserstoffoxidierende) Organismen (und der Verwendung von CO₂ oder Sauerstoff als Elektronenakzeptor), der oxidierte Elektronendonator entweder in Form von Wasser oder als Teil einer organischen Verbindung verstoffwechselt wird, fallen unerwünschte Atmungsendprodukte wie zum Beispiel SO₄²⁻, Fe³⁺ und NO₃⁻ bei einer Nutzung von Sulfid-, Eisen- oder Ammonium-oxidierenden chemoautotrophen Mikroorganismen an (Fuchs *et al.*, 2017). Daher konzentriert sich die Forschung zur biotechnologischen Nutzung chemoautotropher Organismen hauptsächlich auf wasserstoffoxidierende Mikroorganismen (Thakur *et al.*, 2018). Zwar sind die Wachstumsbedingungen hydrogenotropher Organismen deutlich milder - und erfordern somit einen geringeren Energieeintrag - als die Reaktionsbedingungen einer chemischen Umsetzung von CO₂ und H₂, jedoch ergibt sich, wie zu Beginn bereits erwähnt, auch hier die Herausforderung der nachhaltigen und ökonomisch rentablen Produktion von Wasserstoff. Ferner müssen bei der Entwicklung eines geeigneten Bioreaktors die häufig hohen, industriellen Auflagen für Explosionsschutz berücksichtigt werden (Steen, 2000).

Vor wenigen Jahren wurde elektrischer Strom als eine weitere mögliche Energiequelle für die mikrobielle CO₂-Fixierung identifiziert. So konnten Wissenschaftler der Arbeitsgruppe von Bruce Logan eine direkte Konversion von CO₂ und elektrischem Strom zu Methan mit Hilfe von kathodischen Biofilmen nachweisen (Cheng *et al.*, 2009). Elektroautotrophe

Organismen nutzen dabei Elektronen einer Kathode mit niedrigem Redoxpotential als alleinige Energie- und Elektronenquelle für die Reduktion von CO₂. Die Verwendung elektroautotropher Mikroorganismen in einem biotechnologischen CCU-Verfahren wird als Mikrobielle Elektrosynthese (MES) bezeichnet (Nevin *et al.*, 2011). Dieser Prozess gehört zu den sogenannten mikrobiellen elektrochemischen Technologien (METs) (Schröder *et al.*, 2015). Im folgenden Abschnitt sollen daher näher auf diese Systeme, insbesondere auf den Prozess der Mikrobiellen Elektrosynthese eingegangen werden.

1.4 Mikrobielle elektrochemische Technologien

Da eine Zelle aus thermodynamischer Sicht nicht als ein abgeschlossenes System betrachtet werden kann, muss diese kontinuierlich Energie aufbringen, um ihre thermodynamische Ordnung aufrecht zu erhalten (Zellerhalt) oder gar zu erweitern (Zellwachstum). Dieser Energieeintrag kann durch die grundlegenden biologischen Mechanismen der Atmung, Gärung und Photosynthese gewährleistet werden (Fuchs *et al.*, 2017; Kato, 2015). All diese Prozesse können letztendlich auf eine Oxidation und Reduktion chemischer Verbindungen zurückgeführt werden, wobei die dabei freiwerdende Energie in Form chemischer Energieäquivalente – konkret ATP – gespeichert wird. Während die meisten Mikroorganismen solch energiebringende Reaktionen löslicher oder gasförmiger, redoxaktiver Komponenten in der Zelle ablaufen lassen, existiert eine Reihe von Mikroorganismen, die in der Lage sind, extrazelluläre, unlösliche Materialien als Elektronendonator, bzw. -akzeptor zu nutzen (Gralnick & Newman, 2007). Dieser Prozess, bei dem Mikroorganismen Elektronen in die Zelle hinein (oder aus der Zelle hinaus) transportieren, wird als extrazellulärer Elektronentransport (EET) bezeichnet. Die recht junge Disziplin der mikrobiellen Elektrochemie – ein Teilgebiet der Bioelektrochemie – befasst sich mit der Untersuchung und der Anwendung von EET-basierten Interaktionen von Mikroorganismen und Elektronenleitern (Friedman *et al.*, 2013; Schröder *et al.*, 2015). So gibt es Mikroorganismen, die eine biochemische Oxidation von organischen Verbindungen betreiben und die dabei anfallenden Elektronen auf eine Anode übertragen können. Analog sind – wie bereits erwähnt - Mikroben bekannt, welche in der Lage sind Elektronen von einer Kathode aufzunehmen und für metabolische Reaktionen, wie zum Beispiel der Fixierung von Kohlenstoffdioxid, zu nutzen (Rosenbaum & Franks, 2014). Die mikrobielle Elektrokatalyse kann auch als die Reduktion des Überpotentials einer elektrochemischen Reaktion durch Mikroorganismen definiert werden. Als Überpotential versteht man die Differenz einer tatsächlich für eine elektrochemische Reaktion benötigten Spannung und des theoretischen, anhand der Nernst-Gleichung berechneten, Potentials für diese Reaktion

(Bard *et al.*, 2012; Yates *et al.*, 2014). Mikrobielle elektrochemische Technologien sind Anwendungen, welche sich die direkte oder indirekte, elektrochemische Interaktion von Mikroorganismen und Elektroden zu Nutze machen (Schröder *et al.*, 2015). Man unterscheidet dabei zwischen primären und sekundären METs: Bei sekundären METs findet keine direkte physiologische Interaktion der Mikroorganismen mit den Elektroden über EET statt. Die an die Elektroden angelegten Potentiale liegen dabei oftmals nicht in einem im natürlichen Habitat der Mikroorganismen auftretenden und physiologisch relevanten Potentialbereich. Ein Beispiel für sekundäre mikrobielle elektrochemische Technologien ist die elektrochemische Kontrolle und Justierung der mikrobiellen Umgebung (z.B.: pH-Wert, O_2 -/ H_2 -Partialdruck oder die Konzentration des metabolen Substrates oder Produktes im Medium). Eine primäre MET hingegen beruht auf den direkten Interaktionen kapazitiver oder faradayscher Art von Mikroorganismen und einer Elektrode. Diese Interaktionen müssen dabei in einem physiologischen Potentialfenster ablaufen, welches den natürlichen Redoxbedingungen im Lebensraum der jeweiligen Mikroorganismen entspricht (Schröder *et al.*, 2015). In der Literatur wird häufig das Synonym BES (*bioelectrical system*) als Synonym für primäre METs verwendet. Dabei können entweder nur eine Anode/Kathode oder auch beide Elektroden funktional mit einem entsprechenden mikrobiellen Prozess gekoppelt sein. Funktionsunabhängig bestimmt stets die Differenz des Redoxpotentials der anodischen Oxidation und der kathodischen Reduktion, ob elektrischer Strom produziert wird oder ob ein elektrischer Energieeintrag in das System notwendig ist (Rosenbaum & Franks, 2014).

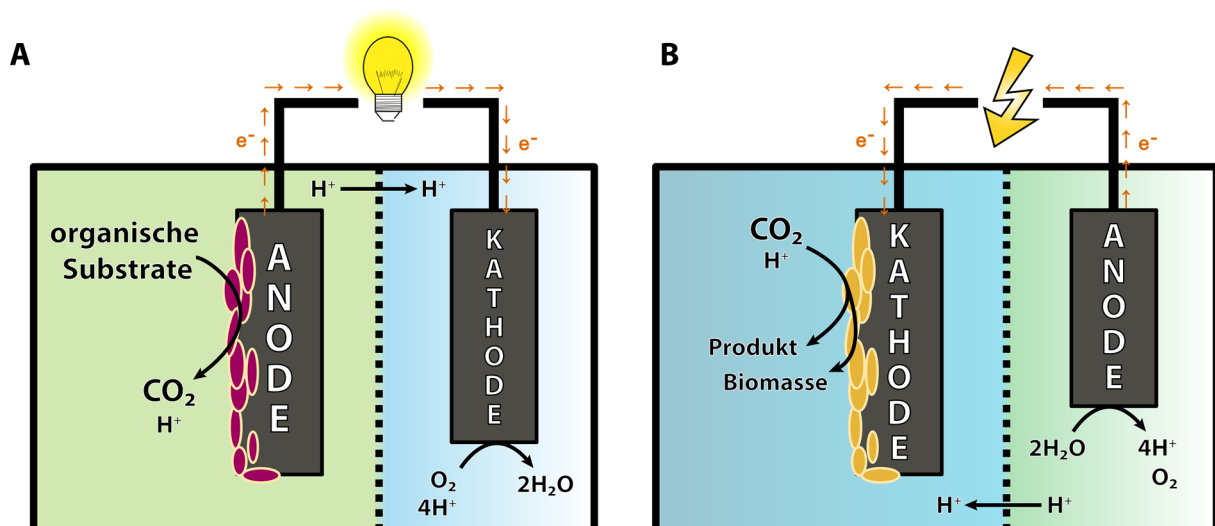


Abb. 3: Vereinfachte Darstellung verschiedener Anwendungsbeispiele primärer METs. A. Mikrobielle Brennstoffzelle B. Mikrobielle Elektrosynthesezelle.

Die am besten untersuchte primäre MET ist die sogenannte Mikrobielle Brennstoffzelle (MFC - *Microbial Fuel Cell*) (Patil *et al.*, 2015; Schröder, 2012). Im Anodenkompartiment einer MFC

werden organische Verbindungen durch sogenannte exoelektrogene Mikroorganismen zu reduzierten Produkten, wie zum Beispiel CO_2 oder Acetat, oxidiert. Die dabei freiwerdenden Elektronen werden von Mikroorganismen via EET auf die Anode übertragen. Hierfür müssen anaerobe Bedingungen im Anodenraum herrschen, da der EET auf eine Anode physiologisch gesehen meist einer anaeroben Atmung entspricht. Die Elektronen wandern über einen Stromverbraucher zur Kathode wo sie - im einfachsten Fall - auf Sauerstoff übertragen werden. Dieser reagiert letztendlich mit Protonen zu Wasser. Durch eine Salzbrücke oder eine ionendurchlässige Membran zwischen den Elektrodenhalbzellen wird ein Ladungsausgleich gewährleistet (Logan *et al.*, 2006; Patil *et al.*, 2015). Abbildung 3A zeigt eine schematische Darstellung einer MFC. Viele Anwendungen einer MFC, wie die Stromproduktion an abgelegenen Orten und die energieeffiziente Abwasserreinigung, weisen bereits einen vergleichsweise hohen Technologie-Reifegrad auf (Logan & Rabaey, 2012). Weitere potenzielle Anwendungsgebiete stehen unter intensiver Erforschung. Dabei seien vor allem die mikrobielle Wasserentsalzung, die Bioremediation, die Verwendung als Biosensor und der Einsatz bei der sogenannten anodischen Elektrofermentation genannt (Cao *et al.*, 2009; Corbella *et al.*, 2019; Golitsch *et al.*, 2013; Santoro *et al.*, 2017; Sturm-Richter *et al.*, 2015). Dabei werden die durch Fermentation organischer Substrate anfallenden Redoxäquivalente, wie z.B. NADH, nicht wie üblich durch Reduktion und Ausscheidung interner organischer Verbindungen regeneriert, sondern durch die Reduktion eines unlöslichen extrazellulären Elektronenakzeptors (Anode). Dies ermöglicht die Produktion eines einzelnen Produktes, dessen Oxidationsstufe höher sein kann, als die des verwendeten Substrates, wobei elektrischer Strom als Nebenprodukt anfällt (Bursac *et al.*, 2017). Wird zu der bereits durch die Mikroorganismen an der Anode produzierten Spannung einer MFC eine externe Spannung hinzugefügt, spricht man von einer sogenannten Mikrobiellen Elektrolysezelle (MEC – *Microbial Electrolysis Cell*) (Cheng & Logan, 2011). Diese Kopplung einer Bioanode und einer chemischen Kathode ist theoretisch vielseitig zur Elektrosynthese verschiedener anorganischer Produkte denkbar. So konnte bereits die Produktion von H_2 , Natriumhydroxid oder Wasserstoffperoxid in einer MEC nachgewiesen werden, jedoch soll auf diese Anwendung an dieser Stelle nicht weiter eingegangen werden (Rabaey *et al.*, 2010; Rozendal *et al.*, 2009).

Analog zu den eben beschriebenen, anodischen Interaktionen, ist die Kopplung mikrobieller Stoffwechselreaktionen mit kathodischen Reduktionsprozessen ebenfalls möglich. Dabei kann die Kathode als alleiniger Elektronendonator einer mikrobiellen Atmung dienen (Logan *et al.*, 2019). Die kathodischen Elektronen können dabei prinzipiell auf jeden mikrobiellen Elektronenakzeptor zur Energiekonservierung übertragen werden, solange die

Differenz des Redoxpotentials der Kathode und des Elektronenakzeptors eine Energiekonservierung aus thermodynamischer Sicht zulässt. So wurde bereits 1997 eine Steigerung der Sauerstoffreduktionsrate einer Graphitkathode durch die Kolonisierung mit Mikroorganismen beschrieben (Hasvold *et al.*, 1997). Anschließend wurden weitere Elektronenakzeptoren von Biokathoden, wie zum Beispiel SO_4^{2-} , NO_3^- oder CO_2 , identifiziert (Beese-Vasbender, Nayak, *et al.*, 2015; Cheng *et al.*, 2009; Clauwaert *et al.*, 2007). In einem mikrobiellen Elektrosyntheseprozess koppeln elektroautotrophe Mikroorganismen diese Aufnahme kathodischer Elektronen zur Energiekonservierung mit der Fixierung von CO_2 (Nevin *et al.*, 2011). Kohlenstoffdioxid kann dabei als terminaler Elektronenakzeptor dienen, jedoch ist auch die Nutzung weiterer Elektronakzeptoren möglich (Logan *et al.*, 2019). Abbildung 3B zeigt die schematische Darstellung eines mikrobiellen Elektrosynthesereaktors. Die durch eine Wasserspaltung an der Anode freiwerdenden Elektronen gelangen dabei über eine Spannungsquelle auf die Kathode und können von elektroautotrophen Mikroorganismen zur CO_2 -Fixierung genutzt werden.

Für die Anwendung und gezielte Optimierung von METs, insbesondere der mikrobiellen Elektrosynthese, ist ein intensives Verständnis der Mikroben-Elektroden-Interaktion unabdingbar. Dahingehend soll im Folgenden auf die molekularen Mechanismen des Extrazellulären Elektronentransports eingegangen werden.

1.4.1 Extrazellulärer Elektronentransport

Während die molekularen Mechanismen der Aufnahme kathodischer Elektronen durch elektroautotrophe Mikroorganismen noch unter intensiver Erforschung stehen, ist der Elektronentransport aus der Zelle auf einen unlöslichen Elektronenakzeptor bereits weitreichender untersucht (Choi & Sang, 2016; Igarashi & Kato, 2017; Shi *et al.*, 2016). Daher soll zunächst auf die unterschiedlichen Möglichkeiten des EETs aus einer Zelle auf eine Anode eingegangen werden. Anschließend sollen die für den reversen EET von einer Kathode diskutierten Modelle besprochen werden.

1.4.1.1 EET auf eine Anode

Der Elektronentransport von Mikroorganismen auf unlösliche Elektronenakzeptoren respektive eine Anode ist die wohl am besten verstandene Form des EETs. Hierbei kann von Grund auf zwischen zwei Mechanismen - dem direkten und dem indirekten Elektronentransfer - unterschieden werden (Gralnick & Newman, 2007). Der direkte Elektronentransfer wird definiert als ein Elektronentransport, der nicht auf die Diffusion eines mobilen *Elektronenshuttles* zwischen Zelle und Elektronenakzeptor beruht. Elektronen

aus katabolen Oxidationsreaktionen müssen dabei aus dem Cytoplasma oder dem Chinonpool über die innere Membran – und in Gram-negativen Organismen auch über das Periplasma und die äußere Membran – auf zellständige, terminale Reduktasen übertragen werden (Kato, 2015). Die Transportfunktion dieser erweiterten Elektronentransportkette wird typischerweise sogenannten *c*-Typ Cytochromen zugesprochen (Logan *et al.*, 2019). Diese Elektronentransportproteine enthalten mindestens eine Häm-*c*-Gruppe als prosthetische Gruppe. Dabei bilden zwei Cysteinreste des Proteinrückgrates eine Thioetherbindung mit zwei Vinylgruppen der Häm-Gruppe aus. Das Auftreten dieser Cysteine in *c*-Typ Cytochromen ist stark konserviert und kann in der jeweiligen Primärstruktur anhand der Aminosäureerkennungssequenz CXXCH detektiert werden (Barker & Ferguson, 1999). Die wichtigsten Modellorganismen der *c*-Typ Cytochrom-vermittelten Anodenatmung sind *Shewanella oneidensis* und *Geobacter sulfurreducens* (Simonte *et al.*, 2017). Diese Gram-negativen Organismen sind darüber hinaus auch zu einer dissimilatorischen Eisenreduktion befähigt (Weber *et al.*, 2006). Hierbei dient unlösliches dreiwertiges Eisen – Fe(III) - als terminaler Elektronenakzeptor einer anaeroben Atmung und wird zu zweiwertigem Eisen - Fe(II) - reduziert. Ferner enthalten die Genome beider Spezies eine ungewöhnlich hohe Anzahl potenzieller *c*-Typ Cytochrome (Méthé *et al.*, 2003; Schuetz *et al.*, 2009). Exemplarisch soll an dieser Stelle auf die molekularen Details des EETs zur dissimilatorischen Eisenreduktion im Modelorganismus *Shewanella oneidensis* MR-1 eingegangen werden:

Durch die Oxidation von NADH an einer membranständigen Oxidoreduktase werden Elektronen in den Menachinonpool in der Cytoplasmamembran übertragen (Myers & Myers, 2000). Das tetrahäm *c*-Typ Cytochrom CymA, welches im Periplasma lokalisiert ist und über eine Transmembrandomäne in der inneren Membran verankert ist, kann als erste Einheit der verlängerten Elektronentransportkette in *S. oneidensis* gesehen werden. Diese Chinon-Dehydrogenase ist nicht nur für die Reduktion von Fe(III)-Verbindungen, sondern auch für die Reduktion von DMSO, Fumarat, Nitrat und Nitrit essentiell (Schwalb *et al.*, 2003; Simon & Kern, 2008). Über ein komplexes Elektronentransfernetzwerk, welches wohl nicht nur die Aufgabe des Elektronentransports, sondern scheinbar auch die der Elektronenspeicherung übernimmt, werden die Elektronen von CymA durch das Periplasma geleitet (Schuetz *et al.*, 2009; Sturm *et al.*, 2015). Den periplasmatischen *c*-Typ Cytochromen STC und FccA wird dabei eine essentielle Rolle zugesprochen (Sturm *et al.*, 2015). Im Periplasma werden die Elektronen auf den in der äußeren Membran verankerten, sogenannten MtrABC-Komplex übertragen. Dieser Komplex, der in einer 1:1:1 Stöchiometrie vorliegt, ist in der Lage, Elektronen durch eine Doppellipidschicht zu transportieren (Hartshorne *et al.*, 2009).

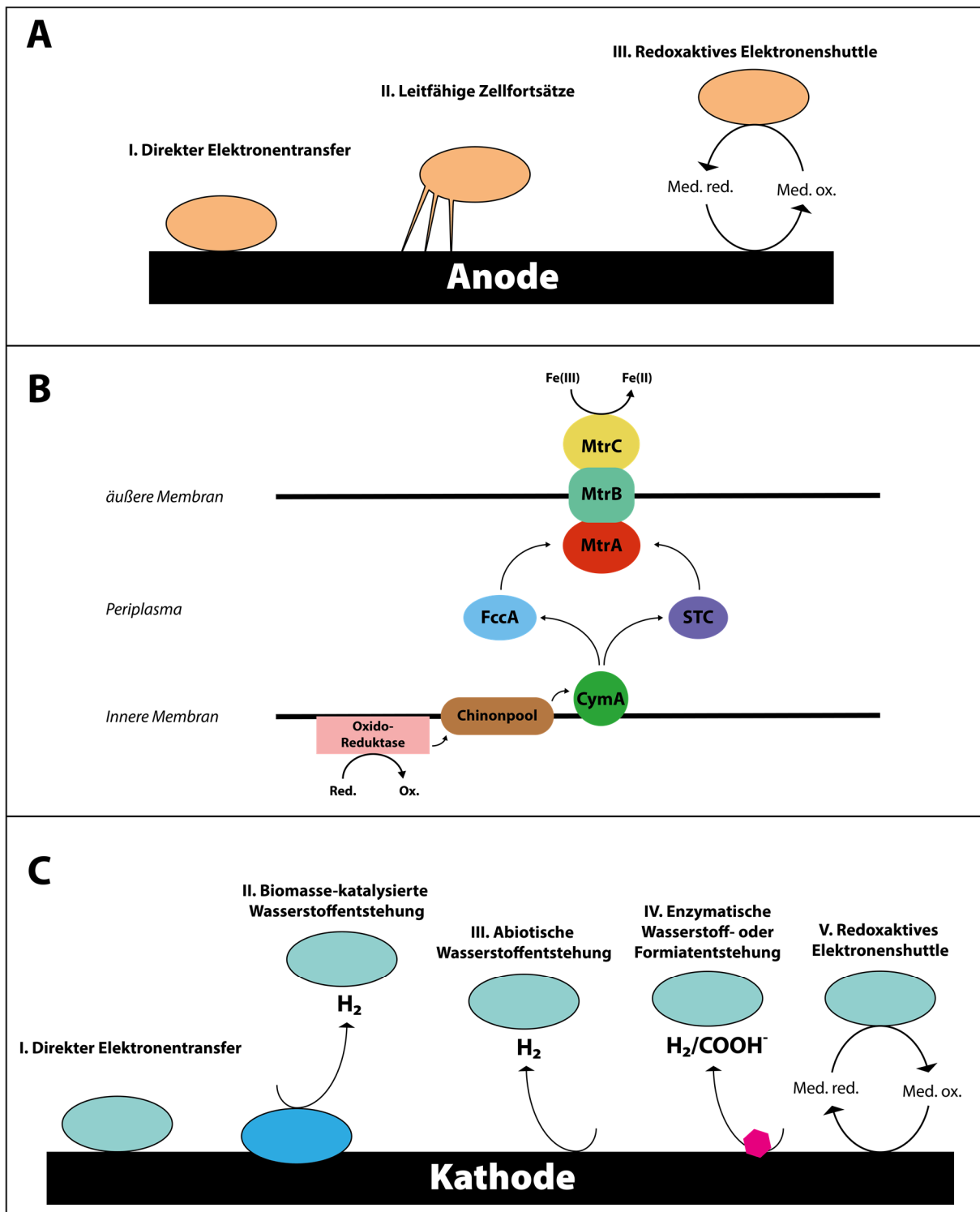


Abb. 4: Übersicht über verschiedene Varianten des EETs. A. Schematische Darstellung des extrazellulären Elektronentransfers auf eine Anode B. Elektronentransport über die verlängerte Elektronentransportkette in *Shewanella oneidensis* C. Übersicht über potenzielle Mechanismen des Elektronentransports von einer Kathode in die Zelle.

Das am Komplex beteiligte β -Fassprotein MtrB ist – trotz fehlender Hämgruppen – essenziell für die Eisenreduktion. Es bildet vermutlich eine Transmembranpore in der äußeren Membran aus und ist zum Periplasma hin mit MtrA und zur Oberfläche hin mit MtrC verknüpft (Beliaev & Saffarini, 1998; Ross *et al.*, 2007). Dem decahäm *c*-Typ Cytochrom MtrC

wird, auf Grund seiner Orientierung nach außen hin, die Funktion einer terminalen Reduktase zugesprochen (Beliaev *et al.*, 2001; Myers & Myers, 2003).

Sowohl *S. oneidensis* als auch *G. sulfurreducens* sind zudem in der Lage, elektrisch leitfähige Filamente auszubilden, durch welche Elektronen über eine gewisse Distanz hinweg direkt auf einen Elektronenakzeptor übertragen werden können. Trotz ähnlicher Funktion unterschieden sich die Filamente der beiden Organismen sowohl in ihrem Aufbau, als auch in ihrer Funktionsweise (El-Naggar *et al.*, 2010; Malvankar & Lovley, 2014). Die genauen molekularen Mechanismen stehen unter großer wissenschaftlicher Debatte. Die Typ IV-Pili ähnlichen Zellfortsätze in *G. sulfurreducens* sollen laut Aussage eines kontrovers diskutierten Modells, metallähnliche Leitungsmechanismen aufweisen (durch Elektronendelokalisation in überlappenden π -Elektronenorbitalen organischer Aminosäuren). Indes wurde jedoch in einer kürzlich erschienenen Publikation ein Aufbau dieser Fortsätze aus dicht gepackten, polymerisierten hexahäm c-Typ Cytochromen postuliert (Wang *et al.*, 2019). Bei den Filamenten von *S. oneidensis* handelt es sich hingegen vermutlich um Ausstülpungen des Periplasmas und der äußeren Membran. Das derzeit für *S. oneidensis* diskutierte Modell der Elektronenleitung entlang der leitfähigen Zellfortsätze beruht auf einem physikalischen Elektronen-Hopping-Effekt zwischen Oberflächen-assoziierten c-Typ-Cytochromen (Pirbadian *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2019).

In Gram-positiven eisenreduzierenden Mikroorganismen konnten bisher – bis auf eine Ausnahme – keine multihäm c-Typ Cytochrome detektiert werden und somit wurde ein alternativer noch unbekannter Mechanismus des EETs auf unlösliche Elektronenakzeptoren vermutet (Carlson *et al.*, 2012). Kürzlich konnten Light *et al.* einen Mechanismus zur Eisenreduktion im Gram-positiven Bakterium *Listeria monocytogenes* beschreiben. Zunächst soll eine spezifische Typ II NADH-Dehydrogenase katabole Elektronen in einen diskreten Chinonpool übertragen. Der Elektronentransfer aus dem Chinonpool auf unlösliche Elektronenakzeptoren soll dann unter der Beteiligung noch uncharakterisierter Membranproteine von einem membranverankerten Flavoproteinkomplex PpIA auf der Zelloberfläche katalysiert werden. (Light *et al.*, 2018).

Neben dem direkten Elektronentransfer auf eine Anode handelt es sich bei der Verwendung eines Elektronenshuttle zum EET um eine weitere Strategie exoelektrogener Mikroorganismen. Shuttle - oder auch Mediatoren - sind lösliche, redox-aktive Moleküle, welche an der Zelloberfläche (oder im Periplasma) reduziert/oxidiert werden und in die Umgebung diffundieren, wo sie extrazelluläre Substrate reduzieren/oxidieren. Dieser Zyklus

kann dabei mehrfach wiederholt werden (Gralnick & Newman, 2007). Man unterscheidet zwischen Mediatoren endogenen und exogenen Ursprungs. So konnte gezeigt werden, dass einige Mikroorganismen redox-aktive Sekundärmetabolite, wie z.B. Phenazine oder Flavine aus der Zelle in die Umgebung sekretieren. Während Phenazine vorwiegend von verschiedenen Pseudomonaden als endogenes Shuttle für den indirekten EET synthetisiert werden, ist *S. oneidensis* für die Sekretion von Flavinen bekannt (Von Canstein *et al.*, 2008; Qiao *et al.*, 2017). Da *S. oneidensis* wie bereits beschrieben auch zu einem direkten EET befähigt ist, wird der quantitative Anteil der über indirekten EET transferierten Elektronen kontrovers diskutiert. *L. monocytogenes* ist ebenfalls zu einem Flavin-basierten indirekten EET in der Lage, kann dabei Flavine jedoch nicht eigenständig synthetisieren und sekretieren (Kotloski & Gralnick, 2013; Light *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2016). In diesem Fall handelt es sich bei Flavinen also um exogene Mediatoren, die im natürlichen Habitat des Organismus gefunden werden können. Weitere Beispiele für natürliche exogene Shuttle sind zum Beispiel Huminstoffe im Boden. Zur Anwendung in METs werden auch häufig synthetische, exogene Shuttle genutzt. Dies ermöglicht auch Mikroorganismen, welche sonst keine exoelektrogene Eigenschaft aufweisen, ein elektrodenvermitteltes Wachstum (Sturm-Richter *et al.*, 2015).

1.4.1.2 EET von einer Kathode

Über den Transport von Elektronen in eine mikrobielle Zelle hinein sind derzeit nur limitierte mechanistische Informationen bekannt (Igarashi & Kato, 2017; Kato, 2016; Logan *et al.*, 2019). Jedoch sind analog zum EET auf eine Anode verschiedene Mechanismen der Elektronenaufnahme denkbar, welche im Folgenden kurz erläutert werden sollen.

Obwohl der direkte EET von einem unlöslichen extrazellulären Elektronendonator unter physiologischen Bedingungen experimentell nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte, wird dieser oftmals postuliert (Guzman *et al.*, 2019; Ishii *et al.*, 2015; Kato, 2016; Logan *et al.*, 2019; Nevin *et al.*, 2010; Rosenbaum *et al.*, 2011; Venzlaff *et al.*, 2013). Dabei wird häufig angeführt, dass in mehreren Arbeiten die Reversibilität der *c*-Typ Cytochrom-basierten Elektronentransportketten aus *S. oneidensis* und *G. sulfurreducens* dokumentiert wurde: So sind anodisch vorkultivierte *Shewanella oneidensis* Biofilme zum Beispiel in der Lage nach einer Umpolarisierung der Elektrode kathodische Elektronen mit einem negativen Potential von -360 mV vs. SHE für die Reduktion von Fumarat aufzunehmen (Ross *et al.*, 2011). Daneben konnte die Reduktion von Sauerstoff durch kathodische *S. oneidensis* Biofilme bei einem Potential von -300 mV vs. SHE beobachtet werden (Rowe *et al.*, 2018). Vorab konnte bereits in verschiedenen *Geobacter*-Spezies ebenfalls die Aufnahme

kathodischer Elektronen, gekoppelt an eine Reduktion von Fumarat, nachgewiesen werden (Dumas *et al.*, 2008). Durch die Etablierung eines CO₂-Fixierungsweges konnte kürzlich die Elektronenaufnahme zur Fumaratreduktion in *G. sulfurreducens* gesteigert werden (Ueki *et al.*, 2018). Darüber hinaus wurden im Genom unterschiedlicher Eisen(II)-oxidierender Mikroorganismen c-Typ Cytochrome gefunden, welche Homologien zu einigen Proteinen der erweiterten Elektronentransportkette aus *Shewanella* aufweisen. Die für die phototrophe Eisen(II)-oxidation des Purpurbakteriums *Rhodospseudomonas palustris* essenziellen c-Typ-Cytochrome PioA und PioB sind beispielsweise homolog zu MtrA und MtrB aus *S. oneidensis*. Des Weiteren konnte die Einschränkung der Fähigkeit zur Eisenreduktion einer *S. oneidensis mtrA*-Deletionsmutante durch die Komplementation mit einem *mtrA*-Homolog aus dem Eisen(II)-oxidierenden Bakterium *Sideroxydans lithotrophicus* wiederhergestellt werden (Liu *et al.*, 2012).

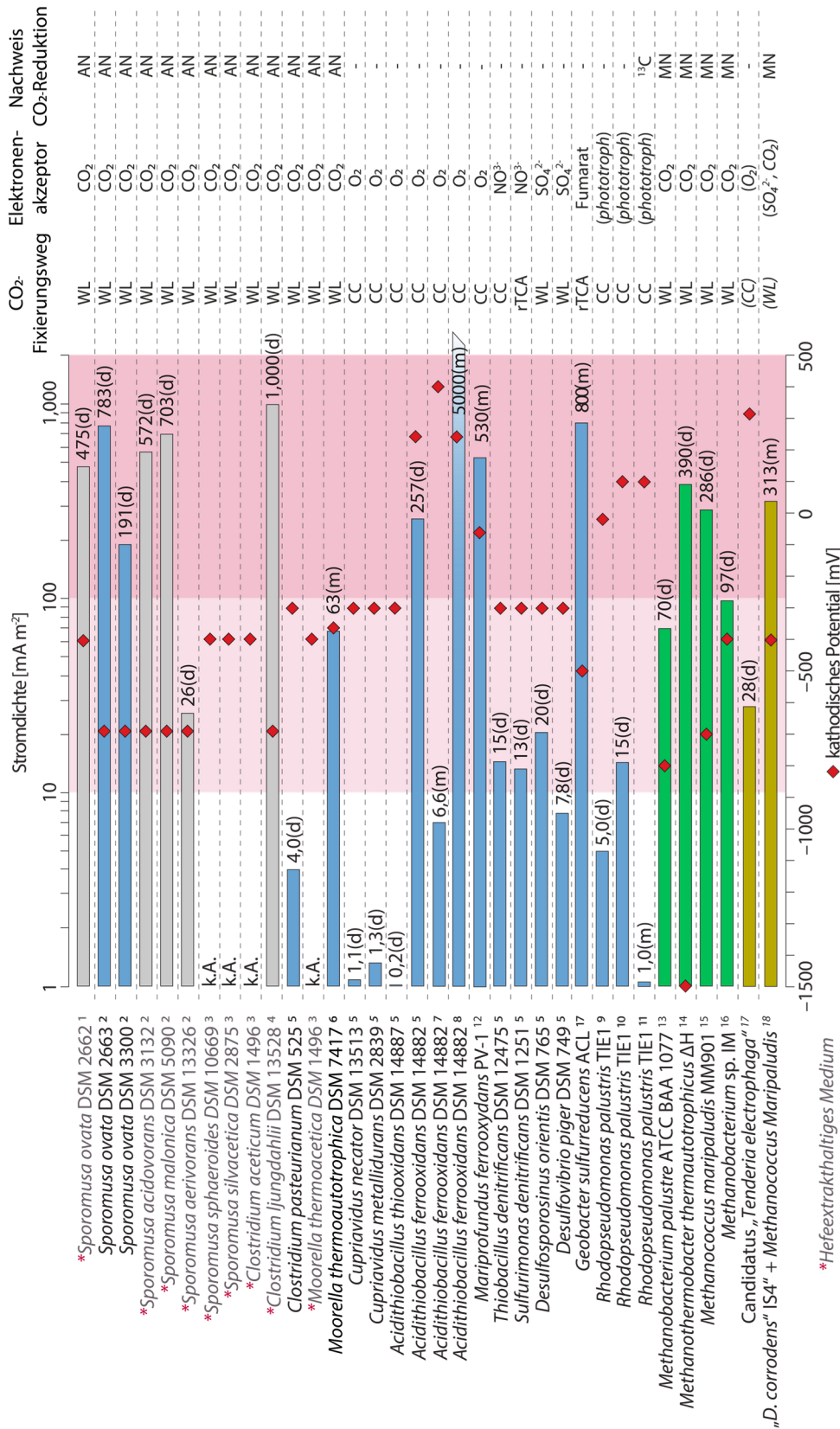
Ferner wurde ein direkter EET für Mikroorganismen postuliert, welche für die mikrobiell induzierte Korrosion (*microbial induced corrosion* - MIC) von elementarem Eisen verantwortlich sind (Venzlaff *et al.*, 2013). Diverse Mikroorganismen unterschiedlicher physiologischer Gruppen sind zu dieser Oxidation von Fe(0) befähigt. Vor allem Vertreter der sulfatreduzierenden und acetogenen Bacteria, aber auch der methanogenen Archaea wird die Fähigkeit zur MIC zugeschrieben (Beese-Vasbender, Nayak, *et al.*, 2015; Deutzmann & Spormann, 2017; Kato, 2016; Logan *et al.*, 2019). Zusätzlich konnte auch eine an die Oxidation von elementarem Eisen gekoppelte Nitratreduktion beschrieben werden (Xu *et al.*, 2013). Obwohl die meisten dieser Organismen in einem bioelektrochemischen System auch kathodische Elektronen als Elektronendonator nutzen können, sind die molekularen Mechanismen der MIC jedoch derzeit nicht bekannt (Kato, 2016). Der Großteil, der zu diesem Zeitpunkt in der Literatur beschriebenen elektroautotrophen Mikroorganismen, ist allerdings nicht dazu in der Lage eine respiratorische Eisenoxidation zu katalysieren, kann jedoch molekularen Wasserstoff als respiratorischen Elektronendonator nutzen. Da in vielen dieser Studien keine oder nur eine sehr geringe kathodische Wasserstoffentwicklung in abiotischen Kontrollexperimenten nachgewiesen werden konnte, wurde die durch zellständige Hydrogenasen vermittelte Elektronenaufnahme, als eine weitere Möglichkeit direkten EETs vorgeschlagen (Mohanakrishna *et al.*, 2015; Rosenbaum & Franks, 2014; Rosenbaum *et al.*, 2011). Jedoch ist die mikrobiell katalysierte Wasserstoffentwicklung an Kathoden in wissenschaftlichen Kreisen ein stark diskutiertes Phänomen und ein indirekter Wasserstoff-basierter EET kann in vielen Studien aus thermodynamischer Sicht nicht ausgeschlossen werden: So muss zur Wasserspaltung an Graphitelektroden unter abiotischen Bedingungen eine Spannung von mindestens ca. 1,9 V aufgebracht werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Biokathode dieses Überpotential deutlich senken

kann. Die genauen Mechanismen dieser Katalyse sind jedoch unklar. Zusätzlich unterscheiden sich die kathodischen Potentiale, bei denen eine Wasserstoffentwicklung beobachtet werden kann, stark. Yates *et al.* konnten eine Wasserstoffentwicklung an einer Biokathode bereits ab einem kathodischen Potential von -600 mV nachweisen. Das Abtöten der Zellen mit Ethanol zeigte keine drastische Veränderung der Wasserstoffproduktion (Yates *et al.*, 2014). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Reduktion des Überpotentials in diesem Falle nicht durch physiologische Prozesse katalysiert wird. Deutzmann *et al.* konnten unter der Verwendung des sulfatreduzierenden MIC-Bakteriums „IS4“ als Biokatalysator in einem bioelektrochemischen System eine Wasserstoffproduktion bereits bei einem Potential von -400 mV nachweisen (Deutzmann & Spormann, 2017). Bei biologischen Standardbedingungen (pH 7) liegt das Redoxpotential der Wasserstoffproduktion aus Elektronen und Protonen bei -413 mV. Bei geringem Wasserstoffpartialdruck (bedingt durch eine sofortige mikrobielle Wasserstoffoxidation) und einem niedrigen pH-Wert kann das Redoxpotential dieser protonenabhängigen Reaktion jedoch deutlich positivere Werte annehmen (z.B. -89 mV bei pH 2 und einem Wasserstoffpartialdruck von 10^{-5}). Neben der abiotischen und der Biomasse-katalysierten Wasserstoffentstehung, konnten Deutzmann *et al.* darüber hinaus auch eine Enzym-basierte Produktion reduzierter Verbindungen, wie zum Beispiel Wasserstoff oder Formiat, durch freie, extrazelluläre Hydrogenasen und Formiatdehydrogenasen als weiteren Mechanismus des indirekten EETs von einer Kathode identifizieren (Deutzmann *et al.*, 2015; Lienemann *et al.*, 2018; Lohner *et al.*, 2014). Neben Wasserstoff und Formiat können – wie auch beim indirekten EET auf eine Anode – weitere endogene oder exogene Stoffe als Elektronenshuttle von einer Kathode in die Zelle dienen. Nur wenige Untersuchungen sind zu dieser Thematik verfügbar. Typische synthetische Elektronenshuttles sind zum Beispiel AQDS, Neutralrot, Methylviolett oder Methylenblau. Die Verwendung von Elektronenshuttles in mikrobiellen Elektrosynthesereaktoren bringt den entscheidenden Vorteil mit sich, dass hierdurch autotrophe Organismen, welche nicht zu einem direkten EET fähig sind, dazu gebracht werden können, Elektronen von einer Kathode aufzunehmen. Jedoch überwiegen die Nachteile der Verwendung synthetischer Mediatoren bei einer potenziellen industriellen Anwendung der Mikrobiellen Elektrosynthese. Dabei sind vor allem die gesteigerten Produktionskosten durch die begrenzte Haltbarkeit der Mediatoren, sowie deren Toxizität und die erschwerte Produktaufreinigung in einem Durchflusssystem zu nennen (Aulenta *et al.*, 2007; Harrington *et al.*, 2015; Kaneko *et al.*, 2017; Paquete *et al.*, 2014; Watanabe *et al.*, 2009).

1.5 Mikrobielle Elektrosynthese – Status quo

Der mikrobiellen Elektrosynthese wird das Potential einer innovativen und zukunftssträchtigen CCU-Technologie zugesprochen (Bajracharya *et al.*, 2017; Logan *et al.*, 2019; Sadhukhan *et al.*, 2016). Mit Hilfe der mikrobiell katalysierten elektrochemischen CO₂-Fixierung könnten die Nachteile klassischer chemischer Synthesen aus CO₂, wie der hohe Wasserstoffverbrauch, teure Katalysatoren und der hohe Energieeintrag, umgangen werden (Batlle-Vilanova *et al.*, 2016). Ferner ermöglicht die Kopplung der mikrobiellen Elektrosynthese mit elektrischem Strom aus regenerativen Energiequellen eine nachhaltige Produktion von Plattformchemikalien aus Kohlenstoffdioxid. Dabei entsteht auch eine interessante Technologie zur temporären Speicherung elektrischer Energie in Form von chemischen Verbindungen. Die umweltbedingte Schwankung der Stromproduktion regenerativer Energien erfordert solche Speichertechnologien, damit eine vollständige Lösung von fossilen Brennstoffen im Energiesektor möglich ist (Nevin *et al.*, 2010). Bei der mikrobiellen Elektrosynthese handelt es sich jedoch um eine recht junge Technologie, welche sich aktuell noch im Anfangsstadium ihrer Erforschung und Entwicklung befindet (Batlle-Vilanova *et al.*, 2017; Logan *et al.*, 2019; Nevin *et al.*, 2010; Rosenbaum & Henrich, 2014). Obwohl bei mikrobiellen Elektrosyntheseprozessen im Labormaßstab coulombsche Effizienzen von über 90 % erreicht werden konnten – d.h. über 90 % der verbrauchten Elektronen können im organischen Endprodukt gefunden werden –, sind die derzeitigen Produktionsraten dieser Technologie für einen ökonomischen Einsatz noch zu gering (Deutzmann & Spormann, 2017). Obgleich ein experimenteller Nachweis fehlt, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der Mikroben-Elektroden-Interaktion um den limitierenden Faktor der Mikrobiellen Elektrosynthese handelt (Rosenbaum & Henrich, 2014). Während die Optimierung der Elektrodenmaterialien als abiotische Komponente rege Entwicklung zeigt, muss daher ein tiefergehendes molekularbiologisches Verständnis des kathodischen EETs erreicht werden (Aryal, Ammam, *et al.*, 2017; Bian *et al.*, 2018; Blasco-Gómez *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2017). Auch wenig ist über die besonderen Qualifikationen bekannt, die ein Organismus mit sich bringen muss, um in der synthetischen Umwelt eines bioelektrochemischen Systems zu prosperieren. So scheint zum Beispiel die Fähigkeit zur effizienten Detoxifizierung von reaktiven Radikalen, welche – insbesondere in oxidischen Systemen – sowohl an Kathode als auch an der Anode entstehen können, eine große Rolle einzunehmen (Li *et al.*, 2012). Außerdem sind mögliche Substratlimitierungen in kathodischen Biofilmen kaum verstanden – insbesondere in Anbetracht der gasförmigen Edukte und derer geringen Löslichkeit im Elektrolytmedium. Im Folgenden sollen nur autotrophe Mikroorganismen, welche in Reinkultur und ohne die Zugabe eines externen

Elektronenshuttles Elektronen von einer Kathode zur CO₂-Reduktion nutzen können, als elektroautotrophe Mikroorganismen bezeichnet werden. In der Literatur sind nur sehr wenige Mikroorganismen mit dieser Fähigkeit beschrieben. Abbildung 5 zeigt eine Übersicht der Organismen, denen autotrophes, kathodisches Wachstum zugesprochen wird. Zwar wird in vielen dieser Studien ein kathodischer Stromverbrauch nach Inkubation mit den aufgeführten Reinkulturen nachgewiesen, doch dieser kann auf Grund eines fehlenden direkten Nachweises häufig nicht mit einer Fixierung von Kohlenstoffdioxid in Zusammenhang gebracht werden. Nur in wenigen Dutzend Mikroorganismen konnte eine Reduktion von CO₂ unter kathodischem Elektronenverbrauch nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich nahezu ausschließlich um methanogene oder acetogene Organismen, bei welchen die CO₂-Fixierung indirekt über einen analytischen Nachweis der respiratorischen Endprodukte Acetat und Methan bestätigt wurde. Jedoch wurde dem Kathodenmedium in vielen dieser Studien teilweise hohe Mengen Hefeextrakt als Wachstumssupplement zugegeben (bis zu 4 g l⁻¹). Somit kann ein indirekter EET durch exogene Mediatoren in diesen Studien nicht ausgeschlossen werden (Logan *et al.*, 2019). Wie bereits eingangs erwähnt, nutzen acetogene und methanogene Mikroorganismen den sauerstoffsensitiven Wood-Ljungdahl-Weg zur Energiekonservierung und CO₂-Assimilation. Damit handelt es sich bei diesen Organismen um strikt anaerobe Mikroorganismen, wohingegen die meisten großen CO₂-Emissionsquellen oxisches Abgas emittieren (Fischedick *et al.*, 2015). Dies würde eine kostspielige Aufreinigung der sauerstoffhaltigen CO₂-Ströme bei einer Verwendung dieser Organismengruppe als Biokatalysator zur mikrobiellen Elektrosynthese erfordern. Darüber hinaus ist die Bandbreite der Verbindungen, die durch die derzeit bekannten elektroautotrophen Mikroorganismen synthetisiert werden können, äußerst gering (Jiang & Jianxiong Zeng, 2018). So sind die respiratorischen Endprodukte der oben genannten Organismengruppe, Acetat und Methan, die mit Abstand häufigsten Produkte der mikrobiellen Elektrosynthese (Hallenbeck *et al.*, 2014). Obwohl es sich bei Acetat sowohl um einen interessanten Ausgangsstoff für weitere Synthesen als auch um ein häufiges mikrobielles Fermentationssubstrat handelt, besitzt dieser Stoff keinen hohen pekuniären Wert. Eine zur Wertsteigerung notwendige, sekundäre Kohlenstoffkettenverlängerung von Acetat hätte einen zusätzlichen, hohen Energieeintrag zur Folge (Fischedick *et al.*, 2015; Vassilev *et al.*, 2018). Bei Methan handelt sich um einen etablierten Brennstoff mit sehr geringer Löslichkeit, wodurch die Aufreinigung aus dem Synthese-Reaktor stark vereinfacht wird. Die Methanproduktion in modernen Biogasanlagen – wie bereits vielfach in der Anwendung – stellt jedoch momentan eine überlegene und profitable Alternative dar. Eine spezifische Produktsynthese energetisch aufwändiger und längererkettiger Verbindungen ist, bedingt durch die Koppelung der Energiekonservierung mit der CO₂-Fixierung, in acetogen-



*Hefeextraktalthaliges Medium

Abb. 5 Übersicht über den kathodischen Stromverbrauch verschiedener autotropher Organismen, die verwendeten CO₂-Fixierungswege und Elektronenakzeptoren, sowie erbrachte CO₂-Fixierungsnachweise. Erweitert und verändert nach Logan (Logan et al., 2019). Die Balkenlänge entspricht der durchschnittlichen (d) oder maximalen (m) Stromdichte. Das kathodische Potential wird durch die Position der roten Raute angegeben. Blaue und graue Balken sind Bacteria zugehörig, grüne Balken wurden für Archaea gewählt. Bei gelben Balken handelt es sich nicht um eine Reinkultur. k.A. – keine Angabe; WL – Wood-Ljungdahl-Weg; CC – Calvinzyklus; rTCA – reduktiver Citratzyklus; AN – Acetatnachweis; MN – Methannachweis; ¹³C – Nachweis der CO₂-Fixierung durch Isotopenanalysen. ¹ - (Zhang et al., 2013); ² - (Aryal, Tremblay, et al., 2017); ³ - (Nevin et al., 2011); ⁴ - (Bajracharya et al., 2015); ⁵ - (de Campos Rodrigues & Rosenbaum, 2014); ⁶ - (Yu et al., 2015); ⁷ - (Ishii et al., 2015); ⁸ - (Carbajosa et al., 2010); ⁹ - (Doud & Angenent, 2014); ¹⁰ - (Bose et al., 2014); ¹¹ - (Guzman et al., 2019); ¹² - (Summers et al., 2013); ¹³ - (Cheng et al., 2009); ¹⁴ - (Sato et al., 2013); ¹⁵ - (Lohner et al., 2014); ¹⁶ - (Beese-Vasbender, Grote, et al., 2015); ¹⁷ - (Deutzmann & Spormann, 2017); ¹⁸ - (Wang et al., 2015).

en und methanogenen Organismen kaum möglich. Dies liegt zum einen an der geringen energetischen Ausbeute bei der Verwendung von CO_2 als Elektronenakzeptor einer anaeroben Atmung, aber auch an dem nur geringen Teil des reduzierten Kohlenstoffs der im Wood-Ljungdahl-Weg tatsächlich für anabole Synthesen genutzt werden kann. Somit sind elektroautotrophe Organismen, die einen anderen Elektronenakzeptor als CO_2 und somit meist auch einen anderen CO_2 -Fixierungsweg als den Wood-Ljungdahl-Weg zur Kohlenstoffassimilierung nutzen, von großem Interesse für die Weiterentwicklung der mikrobiellen Elektrosynthese. Dabei stellt Sauerstoff den aus Sicht einer industriellen Anwendung am besten geeigneten Elektronenakzeptor für einen mikrobiellen Elektrosyntheseprozess dar. So ist Luftsauerstoff günstig und ubiquitär verfügbar und ist darüber hinaus ohnehin in CO_2 -reichen Abgasgemischen vorhanden. Bei einem Einsatz von Sulfat oder Nitrat als Elektronenakzeptor müssten hingegen große Mengen eines Feststoffes bewegt werden, wodurch ein Anstieg der Prozesskosten zu erwarten wäre. Ferner wird Sulfat als terminaler Elektronenakzeptor in einem bioelektrochemischen System zu toxischem Schwefelwasserstoff als respiratorisches Endprodukt umgesetzt. Obwohl vor allem eisenoxidierende Mikroorganismen, wie zum Beispiel *Acidithiobacillus ferrooxidans* oder *Mariprofundus ferrooxydans*, einen Stromverbrauch in einem mikrobiellen Elektrosynthesereaktor unter Verwendung von Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor katalysieren, konnte noch kein direkter Nachweis der CO_2 -Reduktion durch diese Organismen erbracht werden. Eine Wood-Ljungdahl-Weg-unabhängige CO_2 -Fixierung in einem bioelektrochemischen System wurde bisher lediglich für das photoautotrophe Purpurbakterium *Rhodospseudomonas palustris* nachgewiesen. Die Lichtabhängigkeit der kathodischen Elektronenaufnahme durch *R. palustris* steht allerdings im Widerspruch zu den beschriebenen Vorteilen der mikrobiellen Elektrosynthese. Wenig Aufmerksamkeit wurde der Verwendung von sogenannten Knallgasbakterien als Biokatalysatoren in mikrobiellen Elektrosynthesereaktoren geschenkt. Diese Organismen sind unter physiologischen Bedingungen, ähnlich wie acetogene und methanogene Mikroorganismen, zu einer Wasserstoffoxidation befähigt, übertragen die dabei anfallenden, respiratorischen Elektronen allerdings nicht auf CO_2 , sondern auf Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor. Es konnte bisher allerdings kein elektroautotrophes Knallgasbakterium beschrieben werden. Zusammenfassend kann die Suche nach neuen elektroautotrophen Organismen und deren Charakterisierung als ein entscheidender Schritt zur Weiterentwicklung der mikrobiellen Elektrosynthese genannt werden. Dabei muss insbesondere ein Fokus auf die Isolierung aerober Mikroorganismen gerichtet werden, um den oben genannten Nachteilen acetogener und methanogener Organismen entgegen zu wirken. Darüber hinaus ist ein tiefergehendes Verständnis des kathodischen EETs in

elektroautotrophen Mikroorganismen zur Steigerung der Umsatzraten dieser zukunftsweisenden Technologie notwendig.

1.6 Vorarbeiten

In einer dieser Arbeit vorangegangenen Masterarbeit konnte ein thermoacidophiles Knallgasbakterium der Gattung *Kyrpidia* aus einem kathodischen Biofilm isoliert werden. Dieser Biofilm wurde im Rahmen einer Dissertation über mehrere Monate hinweg bei 60 °C und pH 3,5 in einem mikrobiellen Elektrosynthesereaktor angereichert und weitreichend charakterisiert. Als Inokulum dienten Wasser- und Sedimentproben, welche unterschiedlichen geothermalen Quellen der Azoren entnommen wurden. Mittels Isotopenanalyse konnte eine stromabhängige CO₂-Fixierung des Biofilms nachgewiesen werden. Im Rahmen der Masterarbeit konnten erste Hinweise auf eine mögliche Elektroautotrophie der Reinkultur erbracht werden. Darüber hinaus zeigten phylogenetische Untersuchungen, dass es sich bei diesem Isolat möglicherweise um eine neue Art handeln könnte. Des Weiteren wurde während dieser Masterarbeit eine weitere Anreicherungskampagne zur Isolierung mesophiler, elektroautotropher Organismen gestartet. Dabei wurden mikrobielle Elektrosynthesereaktoren mit unterschiedlichen Umweltproben inokuliert und bei 30 °C über mehrere Monate hinweg inkubiert. Die angereicherten, kathodischen Biofilme wurden phylogenetisch untersucht und dienten anschließend als Inokulum für Isolationsversuche, wobei mit verschiedenen Flüssigmedien und Elektronenakzeptoren gearbeitet wurde. Dabei konnten unter anderem zwei Knallgasbakterien der Gattungen *Hydrogenophaga* und *Pseudomonas* stark angereichert, jedoch nicht in Reinkultur gebracht werden.

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung von Knallgasbakterien als Biokatalysatoren in einem oxischen, mikrobiellen Elektrosyntheseprozess. Dabei soll zunächst versucht werden, die in der mesophilen Isolationskampagne angereicherten Knallgasbakterien in Reinkultur zu bringen. Anschließend sollte das elektroautotrophe Wachstum aller aus den initialen Anreicherungen isolierten Reinkulturen in einem bioelektrochemischen System untersucht und verglichen werden. Hierbei sollte ein geeigneter Biokatalysator für einen oxischen mikrobiellen Elektrosyntheseprozess identifiziert und nachfolgend eingehend charakterisiert werden.

II. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Mikroorganismen

In der folgenden Tabelle Tab. 3 sind alle für diese Arbeit relevanten Mikroorganismen aufgeführt. Die angegebenen Stammnummern entsprechen je einer institutsinternen Stammnummer (JG), sowie der offiziellen Stammnummer der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSM).

Tab. 3: In dieser Arbeit in Reinkultur verwendete Stämme. ^T Typstamm.

Stamm	Stammnummer	Relevanter Genotyp	Referenz
<i>Kyrpidia spormannii</i> EA-1 ^T	JG 1376/DSM 106492	WT	Diese Arbeit / (Reiner <i>et al.</i> , 2018)
<i>Kyrpidia tusciae</i> T2 ^T	JG 1377/DSM 2912	WT	(Bonjour & Aragno, 1984)
<i>Pseudomonas</i> sp.	JG 1546/-	WT	Diese Arbeit
<i>Hydrogenophaga</i> sp.	JG 1547/-	WT	Diese Arbeit
<i>Methanococcus maripaludis</i> LL	JG 1548/DSM 14266	WT	(Deutzmann <i>et al.</i> , 2015)

2.2 Chemikalien

Sofern nicht gesondert erwähnt, wurden alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien von den Firmen Air Liquide (Ludwigshafen), AppliChem (Darmstadt), Basi (Rastatt), ChemPur (Karlsruhe), Difco (Augsburg), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

2.3 Rauchgasentnahme

Das als Kohlenstoffsubstrat dienende Rauchgas wurde dem Block 7 des Rheinhafendampfkraftwerks (RDK) der EnBW Kraftwerke AG in Karlsruhe entnommen. Es handelt sich dabei um ein Mittellastkraftwerk, dessen Wirkleistung zum Zeitpunkt der Probenentnahme 531,1 MW betrug. Dies entspricht einer Auslastung der Nennleistung von ~97 %. Das Rauchgas wurde an je zwei Entnahmestellen des Saugzuges abgefüllt. Die beiden Entnahmestellen waren dabei vor und nach der Rauchgasentschwefelungsanlage (REA) positioniert. Das Rauchgas wurde mit Hilfe eines Tygon R6012 Schlauches (Cole-Parmer, Wertheim) und einer Einmal-Injektions-Kanüle (Braun, Melsungen) in 2 l Laborgewindeflaschen (Schott, Mainz) abgefüllt. Da der Saugzug nur einen geringen

Überdruck von lediglich ~15 mbar aufwies, wurden die mit einem Gummistopfen gasdicht verschlossenen Schottflaschen vor der Befüllung vakuumisiert.

2.4 Aufbau der bioelektrochemischen Systeme

2.4.1 Mikrobielle Elektrosynthesereaktor

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Elektrosynthesereaktor handelt es sich um einen sogenannten Ein-Kammer-Aufbau, ausgestattet mit einem Drei-Elektroden-Setup. Das Reaktordesign wurde von Frederik Golitsch entwickelt (Sturm-Richter *et al.*, 2015). Eine schematische Skizze des Aufbaus ist in Abb. 6A gezeigt. Als Arbeitselektrode (Kathode) diente ein Graphitvlies (SIGRATHERM, SGL Group, Wiesbaden), welches eine Dicke von 1 mm und eine Fläche von 16 cm² aufwies. Das Vlies war dabei in einem Polycarbonat-Rahmen eingespannt und nur von einer Seite direkt zugänglich. Die Gegenelektrode (Anode) bestand aus einem 2,5 cm² großem Platinnetz (1014 Maschen cm⁻²; 0,06 mm Drahtdicke, ChemPur, Karlsruhe), welches über einen Platinfaden (0,2 mm Drahtdicke, ChemPur, Karlsruhe) in eine Glasfritte (Porengröße 1-1,6 µm, Robuglas, Hattert) eingelassen war. Hierdurch wurde zwar ein konstanter Austausch der Elektrolyte gewährleistet, andererseits wurde der direkte Kontakt der Mikroorganismen mit der Anode nahezu ausgeschlossen. Die Referenzelektrode diente der Messung von absoluten Potentialwerten. Je nach Verfügbarkeit wurden Standard-Kalomel-Elektroden oder Silber/Silberchlorid-Elektroden (SCL) verwendet (Sensortechnik Meinsberg, Waldheim). Zur Vereinheitlichung werden alle Potentiale in dieser Arbeit immer in Bezug auf eine Standard-Wasserstoff-Elektrode (*Standard Hydrogen Electrode* – SHE) angegeben (-744 mV vs. Kalomel \triangleq -699 mV vs. SCL \triangleq -500 mV vs. SHE; Zur Vereinfachung wurden Temperatur und pH-Wert bei dieser Umrechnung nicht berücksichtigt). Die sterile Begasung (CO₂/O₂, 99,5:0,5, v/v) wurde über eine Glasfritte, welcher ein Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm, Filtropur S, Sarstedt, Nümbrecht) vorgeschaltet war, ermöglicht. Bis auf die Referenzelektrode ist der gesamte Reaktor autoklavierbar. Vor dem Autoklavieren muss das Graphitvlies der Kathode in Isopropanol getränkt werden, um dieses für wässrige Lösungen benetzbar zu machen. Der Reaktor wurde stets, gefüllt mit 2 Litern ddH₂O, autoklaviert und anschließend unter der Sterilbank geleert, mit zwei Litern sterilem Medium (siehe Tab. 18) befüllt und mit 20 ml Zellkultur inokuliert. Zuletzt wurde die Referenzelektrode, welche zuvor in Ethanol und Wasserstoffperoxid sterilisiert wurde, unter der Sterilbank eingesetzt.

A

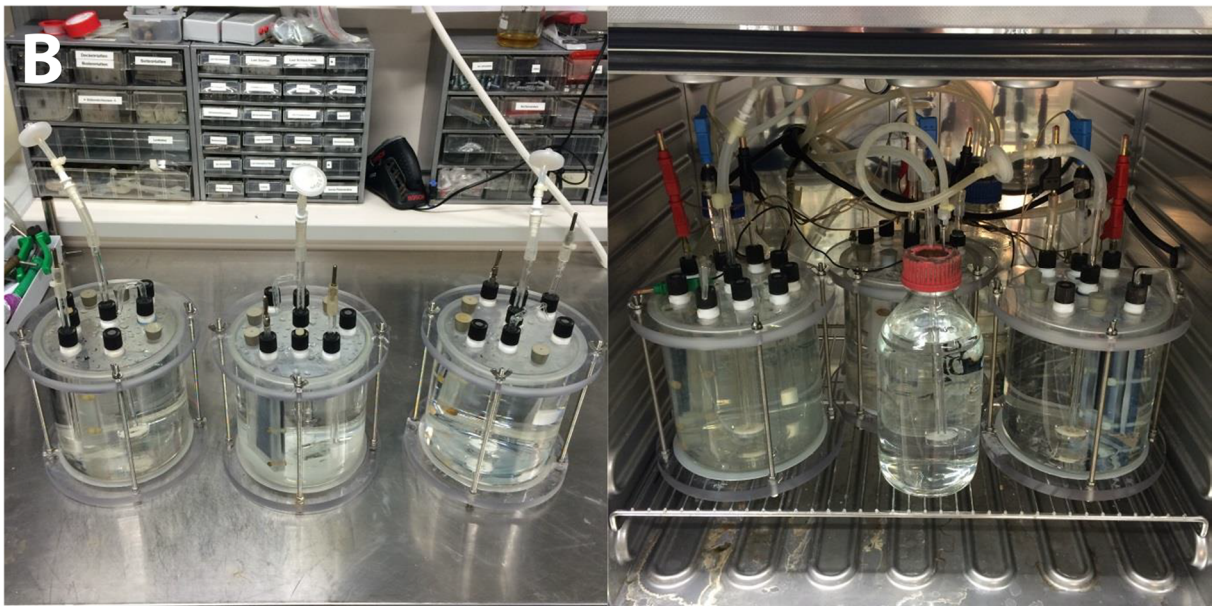
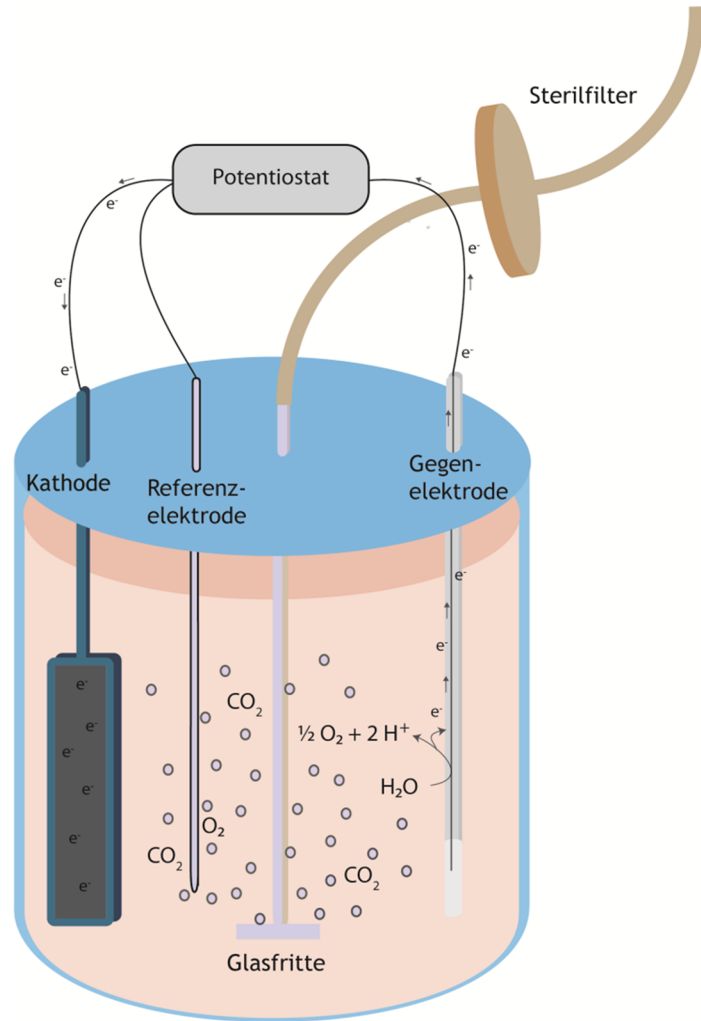


Abb. 6: A. Schematische Darstellung des Aufbaus der in dieser Arbeit verwendeten Synthesereaktoren. B. Lichtbildaufnahme der Synthesereaktoren nach dem Autoklavieren (links) und im Betrieb (rechts).

2.4.2 Fließzellperipherie

Die in dieser Arbeit verwendeten Elektrosynthesefließzellen wurden von Verfahreningenieur Max Hackbarth im Rahmen einer engen Kooperation des Institutes für Angewandte Biologie mit dem Engler-Bunte-Institut des Karlsruher Instituts für Technologie entwickelt. Der Aufbau der Fließzellen ermöglicht eine *in vivo* Analyse des Biofilmwachstums mittels optischer Kohärenztomographie (Siehe Kapitel 2.7.2.).

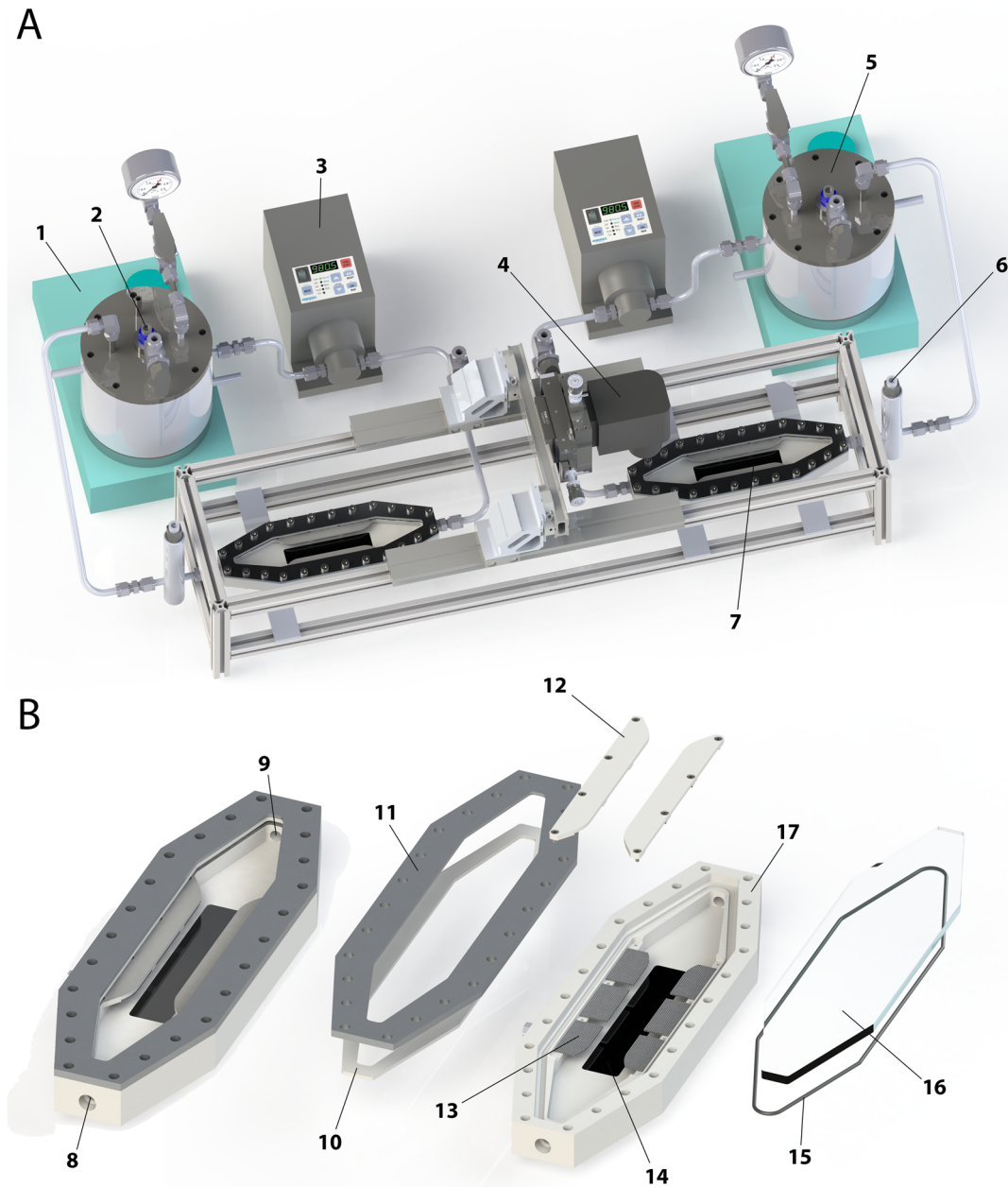


Abb. 7: 3D-Rendering des Fließzellenversuchsaufbaus. A. Fließzellenperipherie. 1 – Magnetrührer; 2 – pH-Elektrode; 3 – Magnetzahnradpumpe; 4 – OCT-Sonde; 5 – Doppelwandiger Edelstahlkessel; 6 – Referenzelektrode; 7 – Fließzelle. B. 3D-Rendering einer assemblierten Fließzelle (links) und zugehörige Explosionszeichnung (rechts); 8 – Zufluss; 9 – Abfluss; 10 – Abstandshalter; 11 – Abdeckung; 12 – Anodenhalterung; 13 – Anodensegment; 14 – Kathode; 15 – O-Ring; 16 – Deckel aus Borosilikatglas; 17 – Gehäuse.

Die gesamte Peripherie ist autoklavierbar und kann mit einem Druck von bis zu 5 bar (im Medienkessel) beaufschlagt werden. Alle verwendeten Materialien weisen erhöhte Druck-, Säure- und Temperaturtoleranz auf, um den Bedingungen eines thermoacidophilen Elektrosyntheseprozesses Stand zu halten: Das Fließzelligegehäuse wurde aus Polyether-Ether-Keton (PEEK), Borosilikatglas und Titanschrauben gefertigt, wohingegen die Peripherie, samt Kessel, Leitungen und Ventilen aus rostfreiem Stahl (316Ti) hergestellt wurden. Um das Medium auf eine Inkubationstemperatur von 60 °C zu erwärmen, wurde der doppelwandige Medienkessel, mit einem Fassungsvermögen von 850 ml Medium, durch eine Wasserbadheizung auf Temperatur gebracht. Zur besseren Versorgung mit den gasförmigen Substraten, wurde der Kessel mit 1,5 bar (CO₂/O₂, 95:5, v/v) bedruckt und das Medium mittels eines Magnetrührers kontinuierlich durchmischt. Das hierdurch mit den gelösten Gasen angereicherte Medium wurde mit einer Flussrate von 100 ml min⁻¹ mittels einer Magnetzahnradpumpe durch die Fließzellen gepumpt (ISMATEC REGLO-Z Digital, Cole-Parmer, Wertheim). Als Kathode diente ein Graphitblock (100 mm × 20 mm; MR40, Müller und Rössner, Troisdorf-Bergheim), welcher in den Boden des PEEK-Gehäuses eingelassen war und somit nur von einer Seite zugänglich war. Sechs Anodenplättchen aus mit Iridium-Tantal beschichtetem Titan (Platinode® - MMO Anode 177, umicore, Schwäbisch Gmünd) wurden an den Seiten des Flusskanales montiert (die Summe der reaktiven Anodenfläche entspricht der zugänglichen Fläche der Graphitkathode). Diese seitliche Positionierung der Anoden resultiert in einer freien Sichtachse durch den Borosilikatglasdeckel auf die sich im Fließkanal befindliche Kathode. Eine Silber-Silberchlorid-Referenzelektrode wurde am Auslass der Fließzelle eingeschraubt (SE231, Sensortechnik Meinsberg, Waldheim). Eine graphische Darstellung der Fließzellenperipherie, sowie eine Explosionszeichnung einer Fließzelle kann Abb. 7 entnommen werden.

2.5 Bakterienzüchtung und Stammkulturerhaltung

2.5.1 Kulturmedien

Alle Medien, Lösungen und Puffer wurden mit deionisiertem Wasser aus einer Reinstwasseranlage (TKA Micropure, TKA, Niederelbert) hergestellt und bei Bedarf autoklaviert (Systec VE-150, Systec, Wettenberg) oder steril filtriert (Filtropur S 0,2 µm, Sarstedt, Nümbrecht). In den folgenden Tabellen (Tab. 4 bis Tab. 17) sind die Grundrezepte aller verwendeten Medien aufgeführt. Wenn nicht besonders vermerkt, sind alle Rezepte auf einen Liter Medium bezogen.

Tab. 4: Grundrezept für einen Liter ES-Medium.

ES-Medium

Substanz	Einwaage/Volumen
NH ₄ Cl	0,53 g
NaCl	0,15 g
KH ₂ PO ₄	0,04 g
0,1 M CaCl ₂	1 ml
1 M MgSO ₄	0,12 ml
Wolfe's mineral elixir (Tab. 5)	1 ml

Tab. 5: Grundrezept für einen Liter Wolfe's mineral elixir (DSM 792). Der pH-Wert wurde vor dem Lösen der Salze mit konz. H₂SO₄ auf pH 1 eingestellt.*Wolfe's mineral elixir*

Substanz	Einwaage
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	30 g
MnSO ₄ × H ₂ O	5 g
NaCl	10 g
FeSO ₄ × 7 H ₂ O	1 g
CoCl ₂ × 6 H ₂ O	1,8 g
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	1 g
ZnSO ₄ × H ₂ O	1,8 g
CuSO ₄ × 5 H ₂ O	0,1 g
KAl(SO ₄) ₂ × 12 H ₂ O	0,18 g
H ₃ BO ₃	0,1 g
Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O	0,1 g
(NH ₄) ₂ Ni(SO ₄) ₂ × 6 H ₂ O	2,8 g
Na ₂ WO ₄ × 2 H ₂ O	0,1 g
Na ₂ SeO ₄	0,1 g

Tab. 6: Grundrezept für einen Liter R2A-Medium (Reasoner & Geldreich, 1985). Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren mit KH_2PO_4 und K_2HPO_4 auf pH 6,6 eingestellt.

R2A-Medium

Substanz	Einwaage
Hefeextrakt	0,5 g
Pepton	0,5 g
Caseinhydrolysat	0,5 g
Dextrose	0,5 g
Stärke	0,5 g
Na-Pyruvat	0,3 g
K_2HPO_4	0,3 g
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,05 g

Tab. 7: Grundrezept für einen Liter modifiziertes R2A-Medium (R2A_M). Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren mit KH_2PO_4 und K_2HPO_4 auf pH 5 eingestellt.

R2A_M-Medium

Substanz	Einwaage
Hefeextrakt	2,5 g
Pepton	1,0 g
Caseinhydrolysat	0,5 g
K_2HPO_4	0,3 g
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,05 g

Tab. 8: Grundrezept für einen Liter *Hydrogenophaga*-Medium. Die Spurenelemente, sowie alle Stammlösungen wurden zunächst sterilfiltriert und dem Grundmedium erst nach dem Autoklavieren hinzugefügt.

Hydrogenophaga-Medium

Substanz	Einwaage/Volumen
NH_4Cl	1 g
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
FeNH ₄ -Citrat	1,2 mg
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	20 mg
→ Autoklavieren und komplementieren mit:	
Spurenelemente (Tab. 12)	Je 5 ml
Na_2HPO_4 Stammlösung (Tab. 9)	10 ml

KH_2PO_4 Stammlösung (Tab. 10)	50 ml
NaHCO_3 Stammlösung (Tab. 11)	12,5 ml

Tab. 9: Grundrezept für einen Liter Na_2HPO_4 Stammlösung.

Na_2HPO_4 -Stamm-Lösung

Substanz	Einwaage
Na_2HPO_4	62 g

Tab. 10: Grundrezept für einen Liter KH_2PO_4 Stammlösung.

KH_2PO_4 -Stammlösung

Substanz	Einwaage
KH_2PO_4	160 g

Tab. 11: Grundrezept für einen Liter NaHCO_3 Stammlösung.

NaHCO_3 -Stammlösung

Substanz	Einwaage
NaHCO_3	40 g

Tab. 12: Grundrezept für einen Liter Spurenelemente.

Spurenelemente Hydrogenophaga-Medium

Substanz	Einwaage
Na_2EDTA	2,5 g
$\text{MnSO}_4 \times 1 \text{ H}_2\text{O}$	21,3 mg
NaCl	58,4 mg
$\text{FeCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$	107,4 mg
CoCl_2	119 mg
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	30 mg
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$	5 mg
H_3BO_3	351 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	93,6 mg
$\text{NiCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	119 mg
Na_2SeO_4	28,3 mg

Tab. 13: Grundrezept für einen Liter *Methanococcus*-Medium. Die Stammlösungen, sowie die Vitamine und Spurenelemente wurden sterilfiltriert und erst nach dem Autoklavieren der restlichen Medienbestandteile hinzugefügt. Das Medium wurde mit NaOH auf pH 7 eingestellt.

Methanococcus-Medium

Substanz	Einwaage
KCl	0,34 g
MgCl ₂ × 6 H ₂ O	4,0 g
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	3,45 g
NH ₄ Cl	0,25 g
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	0,14 g
K ₂ HPO ₄	0,14g
NaCl	18 g
NaHCO ₃	5,0 g
MOPS	41,85 g
Natriumformiat	13,6 g
Resazurin, Natriumsalz (0,1 % w/v)	0,5 ml
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ × 6 H ₂ O (0,1 % w/v)	2,0 ml
→ Autoklavieren und komplementieren mit:	
Methanococcus-Spurenelemente (Tab. 14)	10,0 ml
Methanococcus-Vitaminlösung (Tab. 15)	10 ml
Cystein-Stammlösung	2 ml
Na ₂ S-Stammlösung	2 ml

Tab. 14: Grundrezept für einen Liter *Methanococcus*-Spurenelemente. Bei der Herstellung ist die Reihenfolge der Zugabe der einzelnen Komponenten zu beachten. Der pH-Wert wurde anschließend mit KOH auf 7 eingestellt.

Methanococcus-Spurenelemente

Substanz	Einwaage
Nitrilotriessigsäure	1,5 g
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	3,0 g
MnSO ₄ × H ₂ O	0,5 g
NaCl	1,0 g
FeSO ₄ × 7 H ₂ O	0,1 g
CoSO ₄ × 7 H ₂ O	0,18 g
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	0,1 g
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	0,18 g

$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$	0,01 g
$\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$	0,02 g
H_3BO_3	0,01 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,01 g
$\text{NiCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,03 g
$\text{Na}_2\text{SeO}_3 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$	0,3 mg
$\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,4 mg

Tab. 15: Grundrezept für einen Liter Methanococcus-Vitaminlösung.

Methanococcus-Vitaminlösung

Substanz	Einwaage
Biotin	2,0 mg
Folsäure	2,0 mg
Pyridoxin-HCl	10,0 mg
Thiamin-HCl	5,0 mg
Riboflavin	5,0 mg
Nicotinsäure	5,0 mg
D-Ca-Pantothenat	5,0 mg
Vitamin B ₁₂	0,1 mg
p-Aminobenzoessäure	5,0 mg
Liponsäure	5,0 mg

Tab. 16: Grundrezept für einen Liter L-Cystein-Stammlösung.

L-Cystein-Stammlösung

Substanz	Einwaage
$\text{L-Cystein-HCl} \times \text{H}_2\text{O}$	106,7 g

Tab. 17: Grundrezept für einen Liter Na₂S-Stammlösung.*Na₂S-Stammlösung*

Substanz	Einwaage
$\text{Na}_2\text{S} \times 9 \text{ H}_2\text{O}$	125,0 g

2.5.2 Kultivierungsbedingungen

Sofern nicht besonders vermerkt, wurden alle verwendeten Organismen wie in Tab. 18 angegeben kultiviert. Die Kultivierungsbedingungen zur physiologischen Charakterisierung von *K. spormannii* sind gesondert in Tab. 19 aufgeführt. Laborglasflaschen (Schott, Mainz) dienten als Kulturgefäß bei Inkubation in Flüssigmedien. Diese wurden zur heterotrophen Kultivierung lose mit einem Schraubdeckel verschlossen. Zur autotrophen Kultivierung wurden die Flaschen gasdicht mit einem Gummistopfen verschlossen und die Gasphase mit einer Kanüle ausgetauscht und auf 1 bar bedruckt. Für die Herstellung von Agaroseplatten wurde den verwendeten Medien zusätzlich 2 % Agarose vor dem Autoklavieren hinzugefügt. Agaroseplatten wurden im Falle von autotrophen Wachstum in begas- und bedruckbaren Anaerobengefäßen inkubiert. Diese Gefäße wurden ebenfalls für das heterotrophe Wachstum der thermophilen Organismen als Feuchtekammer verwendet, um ein Austrocknen der Platten zu verhindern. Dabei wurde jedoch auf eine vorherige Begasung verzichtet.

Tab. 18: Kultivierungsbedingungen der in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen.

Verwendete Medien			
	Heterotroph	Autotroph	Elektroautotroph
<i>Pseudomonas sp.</i>	R2A-Medium	<i>Hydrogenophaga</i> - Medium	<i>Hydrogenophaga</i> - Medium
Gasphase	Luft	H ₂ /CO ₂ /O ₂ (80:15:5 v/v/v)	CO ₂ /O ₂ (99,5:0,5 v/v)
Temperatur	30 °C	30 °C	30 °C
<i>Hydrogenophaga sp.</i>	R2A-Medium	<i>Hydrogenophaga</i> - Medium	<i>Hydrogenophaga</i> - Medium
Gasphase	Luft	H ₂ /CO ₂ /O ₂ (80:15:5 v/v/v)	CO ₂ /O ₂ (99,5:0,5 v/v)
Temperatur	30 °C	30 °C	30 °C
<i>Kyrpidia spormannii</i>	R2A _m -Medium	ES-Medium	ES-Medium
Gasphase	Luft	H ₂ /CO ₂ /O ₂ (80:15:5 v/v/v) oder H ₂ /Rauchgas (50:50 v/v)	(siehe Tab. 20)
Temperatur	60 °C	60 °C	60 °C
<i>Kyrpidia tusciae</i>	TSB-Medium	ES-Medium	-

Gasphase	Luft	H ₂ /CO ₂ /O ₂ (80:15:5 v/v/v)	-
Temperatur	60 °C	60 °C	-
<i>Methanococcus maripaludis</i>	-	Methanococcus- Medium	-
Gasphase	-	H ₂ /CO ₂ (80:20 v/v)	-
Temperatur	-	37 °C	-

Tab. 19: Zur physiologischen Charakterisierung von *K. spormannii* eingesetzte Medien.

Zur Artcharakterisierung verwendete Medien

Wachstumsparameter	Medium
Temperatur	R2A _m
pH	R2A _m + McIlvaine-Puffer (McIlvaine, 1921)
Inhibitorische Salzkonzentration (NaCl)	ES-Medium + 1 g l ⁻¹ Natriumpyruvat
Stickstoffquellen	ES-Medium (ohne NH ₄ Cl) + 1 g l ⁻¹ N-Quelle
Glukosefermentation	ES-Medium + 1 g l ⁻¹ Glukose
Alternative Elektronenakzeptoren	ES-Medium (anaerob) + 1 g l ⁻¹ Natriumpyruvat + 2 mM KNO ₃ / 50 mM MgSO ₄ / 25 mM DMSO/ 50 mM Na ₂ Fumarat

2.5.3 Stammkonservierung

Zur längerfristigen Lagerung wurden alle in dieser Arbeit verwendeten Anreicherungen und Isolate als Gefrierkultur konserviert. Hierfür wurden 5 % (v/v) DMSO oder 10 % (v/v) Glycerin zu 1 ml der zu konservierenden Kultur hinzugegeben und in ein Kryoröhrchen überführt. Dieses wurde anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

2.6 Elektrochemische Methoden

2.6.1 Chronoamperometrie

Die Chronoamperometrie ist eine elektrochemische Messmethode, bei welcher die bei konstantem Potential (gegen Referenzelektrode) an der Arbeitselektrode gemessenen Stromstärken über die Zeit aufgezeichnet werden. Dabei legt ein Potentiostat (AUTOLAB,

Utrecht; Pine Instruments, USA; Interface 1000B, Gamry Instruments, Warminster, PA USA) mithilfe eines variablen Potentials der Gegenelektrode ein definiertes, konstantes Potential an der Kathode an. Die dabei an Arbeitselektrode gemessene Stromstärke wurde in einminütigen Intervallen gemessen und von einem Computer aufgezeichnet. Das kathodische Potential wurde je nach verwendeter Referenzelektrode auf -744 mV (gegen Kalomel) oder -699 mV (gegen Ag/AgCl, gesättigt) eingestellt. Dies entspricht einem Potential von -500 mV gegen SHE unter Standardbedingungen. Als Negativkontrollen dienten entweder unbeimpfte bioelektrochemische Systeme oder inokulierte Reaktoren, bei welchen lediglich die Leerlaufspannung gemessen wurde (OCP-Kontrolle). Hierbei können aufgrund eines sehr hohen internen Messwiderstands keine Elektronen durch den Potentiostat zwischen Anode und Kathode fließen. Die Reaktoren wurden stets einprozentig (v/v) beimpft. Für das initiale Screening (Kapitel 3.2) dienten autotroph vorkultivierte Reinkulturen als Inokulum. In den übrigen Experimenten dienten dreimal in ES-Medium gewaschene, heterotrophe Kulturen als Inokulum. Eine Ausnahme stellt das ¹³C-Inkorporationsexperiment dar, dessen Durchführung Kapitel 2.10.4 entnommen werden kann. Vor jeder chronoamperometrischen Messung wurde das kathodische Potential von -500 mV vs. SHE mittels linearer Voltammetrie (siehe 2.6.2) langsam eingestellt.

Tab. 20: Auflistung der chronoamperometrischen Versuche und der dafür verwendeten bioelektrochemischen Systeme.

Verwendete bioelektrochemische Systeme

	Bioelektrochemisches System	Begasung	Kapitel
Initiales Screening	Elektrosynthesereaktor	CO ₂ /O ₂ (99,5:0,5 v/v)	3.2
Live/Dead-Färbung	Elektrosynthesereaktor	CO ₂ /O ₂ (99,5:0,5 v/v)	3.5
FISH	Elektrosynthesereaktor	CO ₂ /O ₂ (99,5:0,5 v/v)	3.5
Komparative Transkriptomanalyse	Elektrosynthesereaktor	CO ₂ /O ₂ (95:5 % v/v)	3.6
Atmungsketteninhibitoren	Elektrosynthesereaktor	CO ₂ /O ₂ (99,5:0,5 v/v)	3.8
OCT-Aufnahmen	Fließzellen	CO ₂ /O ₂ (95:5 v/v)	3.9
¹³C-Inkorporationsexperiment	Fließzellen	CO ₂ /O ₂ (99,5:0,5 v/v)	3.10

Die in Kapitel 3.8 verwendeten Atmungsketteninhibitoren, Rotenon, Antimycin A und CCCP (Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon) wurden zunächst in Stocklösungen in Lösung gebracht. Während Rotenon und Antimycin A in DMSO gelöst wurden, wurde CCCP in Ethanol gelöst. Die finale Konzentration im Elektrosynthesereaktor betrug 100 μM pro Inhibitor.

2.6.2 Lineare Voltammetrie

Die lineare Voltammetrie diente der langsamen „Gewöhnung“ der Mikroorganismen an die während der Chronoamperometrie in den bioelektrochemischen Systemen herrschenden Bedingungen, wie zum Beispiel erhöhter Zellstress durch an den Elektroden entstehende Sauerstoffradikale. Das Endpotential der linearen Voltammetrie entsprach dabei stets dem während der nachfolgenden Chronoamperometrie eingestellten Potentials von -500 mV vs. SHE. Als Startpotential wurde ein Potential von 0 mV. vs. SHE gewählt, welches mit einer Durchlaufgeschwindigkeit von 5,8 $\mu\text{V s}^{-1}$ auf das Endpotential erniedrigt wurde.

2.7 Mikroskopische Methoden

2.7.1 Phasenkontrast und Fluoreszenzmikroskopie

Die Phasenkontrastmikroskopie ist ein lichtmikroskopisches Verfahren, bei welchem eine Abbildung von Strukturen mit geringem Eigenkontrast – darunter auch die meisten Mikroorganismen – möglich ist. So sind die meisten Mikroorganismen bei der Hellfeldmikroskopie nur mit künstlicher Einfärbung (z.B.: Gram-Färbung) sichtbar. Die Phasenkontrastmikroskopie nutzt zur Sichtbarmachung der Mikroorganismen die Phasenänderung der Lichtwellen, welche durch das zu beobachtende Objekt dringen. Diese sonst unsichtbare Phasenänderung wird bei der Phasenkontrastmikroskopie in Form einer Helligkeitsänderung sichtbar gemacht.

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

In dieser Arbeit wurde ein Leica Mikroskop vom Typ DM5500B verwendet (Kamera: Leica DFC360FX, 100x Objektiv mit Öl Immersion und Dip-In-Objektiv 63x HCX APO L63/090W mit Wasserimmersion). Die Bilder wurden mit der Leica Software LAS-AF erstellt und teilweise auch mit dieser bearbeitet. Des Weiteren wurde zur mikroskopischen Visualisierung der Biofilmprouben aus den Fließzellen ein Epifluoreszenzmikroskop Axio Imager Z1 mit ApoTome Komponente (Carl-Zeiss, Jena) genutzt. Dreidimensionale Aufnahmen der Kathode wurden nachträglich mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ bearbeitet und in eine 2D Projektion umgewandelt.

2.7.1.1 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung dient der spezifischen Markierung von Zellen mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Oligonukleotid-Sonden. Diese binden spezifisch an die 5S, 16S oder 23S rRNA. Die Sonden sind am 5'-Ende kovalent mit einem Fluoreszenzfarbstoff verbunden. Die gefärbten Zellen weisen somit unter dem Fluoreszenzmikroskop eine dem Farbstoff entsprechende Fluoreszenz auf. Typische Fluoreszenzmarker sind zum Beispiel FITC, Cy3 oder Cy5. Im Folgenden sind sämtliche für diese Färbung verwendeten Lösungen und Puffer aufgelistet:

2.7.1.1.1 Puffer und Lösungen

Tab. 21: Einwaage für 500 ml 10x PBS (*phosphate buffered saline*). Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,5 eingestellt.

10x PBS

Substanz	Einwaage/Volumen
NaCl	40 g
KCl	1 g
Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O	3,82 g
ddH ₂ O	Ad 500 ml

Tab. 22: Grundrezept für 100 ml Fixierungslösung.

Fixierungslösung

Substanz	Volumen
10x PBS pH 7,5	10 ml
37 % Formaldehyd	10,8 ml
ddH ₂ O	79,2 ml

Tab. 23: Zusammensetzung der Hybridisierungspuffer mit unterschiedlichen Formamidkonzentrationen (FA) 0, 20 und 35 %.

<i>Hybridisierungspuffer</i>			
	0 % FA	20 % FA	35 % FA
Substanz	Volumen		
5 M NaCl	1,08 ml	1,08 ml	1,08 ml
1 M TrisHCl pH 8	0,12 ml	0,12 ml	0,12 ml
ddH ₂ O	4,8 ml	3,6 ml	2,7
20 % SDS	3 µl	3 µl	3 µl
Formamid	0 ml	1,2 ml	2,1 ml

Tab. 24: Komponenten der drei verwendeten Waschpuffer (bezogen auf die Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer).

<i>Waschpuffer</i>			
	0 % FA	20 % FA	35 % FA
Substanz	Volumen		
5 M NaCl	4 ml	2,15 ml	0,7 ml
1 M TrisHCl pH 8	1 ml	1 ml	1 ml
0,5 M EDTA pH 8	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
ddH ₂ O	ad 50 ml	ad 50 ml	ad 50 ml
20 % SDS	25 µl	25 µl	25 µl

Tab. 25: Einwaage für 500 ml 20x SSC. Der pH-Wert von 6 ist mit HCl einzustellen.

<i>20x SSC</i>	
Substanz	Einwaage/Volumen
NaCl	87,65 g
Na ₃ Citrat × 2 H ₂ O	44,1 g
ddH ₂ O	ad 500 ml

2.7.1.1.2 Probenfixierung

Flüssigkulturen wurden zunächst durch Zentrifugation (5 min, 10.000 × g) ankonzentriert und das Zellpellet anschließend in 2 ml Fixierungslösung aufgenommen. Kathodenstücke wurden direkt in 2 ml Fixierlösung gelegt. Flüssigkulturen mussten 1 h und Kathoden 4 h bei 4 °C inkubiert werden. Danach wurden die Flüssigkulturen abzentrifugiert (5 min, 10.000 × g) und zweimal 30 min in 1x PBS gewaschen. Die gleichen Waschschrte wurden mit den Kathodenfragmenten durchgeführt, dabei wurde jedoch auf die

Zentrifugationsschritte verzichtet. Abschließend wurden die fixierten Proben in $1 \times$ PBS mit 50 % (v/v) EtOH bei -20°C gelagert.

2.7.1.1.3 Permeabilisierung

10 μl der fixierten Flüssigkulturen wurden auf beschichtete Objektträger gegeben und bei 37°C getrocknet. Die getrocknete Probe wurde mit 0,1 %iger *low-melt* Agarose beträufelt und bei 37°C für 30 min erneut getrocknet. Anschließend wurden die Objektträger für je drei Minuten in einer steigenden Ethanol-Reihe dehydriert (50 %, 80 % und 100 % Ethanol). Nach vollständiger Trocknung können die Objektträger bei 4°C gelagert oder direkt weiterverwendet werden. Die Kathoden können nach der Fixierung umgehend permeabilisiert werden. Hierzu wurden die Kathoden oder Objektträger zehn Minuten in 0,1 M HCl eingetaucht und anschließend kurz mit ddH₂O gewaschen. Eine effektivere Permeabilisierung kann durch eine halbstündige Behandlung mit 0,5 % SDS in PBS und das anschließende Waschen mit ddH₂O erreicht werden. Des Weiteren kann eine einstündige Inkubation bei 37°C mit 100 mg Lysozym in 1 ml 0,5 M EDTA (pH 8) und 1 ml TrisHCl (pH 8) die Permeabilität steigern. Auch hiernach muss die Probe mit ddH₂O gewaschen und getrocknet werden.

2.7.1.1.4 Hybridisierung

Die Hybridisierung der Sonden (2 h Inkubationszeit) wurde im vorgeheizten Hybridisierungssofen bei 46°C durchgeführt. Die Proben auf dem Objektträger wurden hierfür im Dunkeln mit 10 μl der *Working solution*, welche aus 148 μl Hybridisierungspuffer (mit der für die Sonde entsprechenden Formamidkonzentration) und 1 μl Sonde besteht, bedeckt. Um ein Austrocknen der Objektträger zu vermeiden, wurden diese in einer, der Formamidkonzentration der *Working solution* entsprechenden Atmosphäre aus Formamid und ddH₂O, in verschlossenen 50 ml Schraubdeckelgefäßen inkubiert. Die Sondenkonzentration zur Hybridisierung der Kathoden wurde auf Grund der größeren Biomasse höher gewählt (100 μl Sonde + 1,3 ml entsprechender Hybridisierungspuffer). Die Kathoden wurden mit 1,4 ml der *Working solution* bedeckt.

Tab. 26: Verwendete FISH-Sonde.

Name	Sequenz (5'-3')	Spezifität	Referenz	FA [%]
EUB388-I	[CY3]-GCTGCCTCCCGTAGGAGT	Eubacteria	(Stahl & Amann, 1991)	20

2.7.1.1.5 Waschschritte

Der Waschpuffer muss für die jeweilige Formamidkonzentration frisch hergestellt und auf 48 °C vorgewärmt werden. Die Proben (Kathoden oder Objektträger) wurden zunächst im Dunkeln mit Waschpuffer abgespült und anschließend unter Lichtausschluss in frischem Waschpuffer bei 48 °C im Wasserbad inkubiert. Nach kurzem Spülen mit ddH₂O wurden die Proben für 10 min in 1x SSC gegeben. Nach anschließendem Trocken ist die Hybridisierung abgeschlossen.

2.7.1.1.6 DAPI-Färbung

Zur unspezifischen Färbung der zellulären DNA wurden die Proben in 1 µg ml⁻¹ DAPI für 5 Minuten inkubiert und anschließend zweimal eine Minute mit ddH₂O gewaschen.

2.7.1.1.7 Einbettung und Lagerung

Nach beendeter Färbung wurden die Objektträger mit einem Tropfen Einbettpuffer pro Probenvertiefung benetzt und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Objektträger konnten so bei -20 °C gelagert werden. Anschließend wurden die *Slides* unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Kathoden wurden in einer Petrischale in ddH₂O/Ethanol (50:50 v/v) bei 4 °C gelagert. Zur mikroskopischen Analyse wurden die Kathoden mit doppelseitigem Klebeband auf dem Boden der Petrischale fixiert und mit ddH₂O überschichtet. Die Kathoden konnten so mit einem Keramik-Dip-In-Objektiv (63x HCX APO L63/090W, Wasserimmersion) betrachtet werden.

2.7.1.2 *Live-Dead*-Färbung

Zur Bestimmung der Viabilität des kathodischen Biofilms wurde das kommerziell erhältliche *LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit* verwendet (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA USA). Diese Färbung basiert auf der unterschiedlichen Membrangängigkeit zweier Fluoreszenzfarbstoffe. Während der grünfluoreszierende Farbstoff SYTO 9 membrangängig ist und sowohl lebende und tote Zellen färbt, kann der rote Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid die Zellmembran intakter Zellen nicht durchdringen. Lediglich tote Zellen mit eingeschränkter Membranintegrität werden angefärbt. Die Färbung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierzu wurden die nach Beendigung der Chronoamperometrie umgehend aus den bioelektrochemischen Systemen ausgebauten Kathoden für 15 Minuten in eine Färbelösung (siehe Tab. 27) eingelegt und sofort unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

Tab. 27: Grundrezept für einen Milliliter Live-Dead-Färbelösung.

Färbelösung Live-Dead	
Substanz	Volumen
20 mM Propidiumiodid in DMSO	300 μ l
3,34 mM Syto 9 in DMSO	300 μ l
ES-Medium	1 ml

2.7.1.3 Nilrot-Färbung

Die Visualisierung intrazellulärer PHB-Granula wurde in dieser Arbeit mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Nilrot ermöglicht. Dieser Phenoxazin-Farbstoff bindet spezifisch an hydrophobe Strukturen und weist dabei eine spezifische Fluoreszenz auf. Mit einem Absorptionsmaximum bei 535 nm und einem Emissionsmaximum bei 605 nm konnte die Fluoreszenz der PHB-Granula unter dem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Zur eigentlichen Färbung wurde eine Färbelösung mit einer Nilrot-Konzentration von $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ in ES-Medium hergestellt. Dabei wurde auf eine Stammlösung (125 μg Nilrot in 1 ml DMSO) zurückgegriffen. Die Zellen wurden für 5 Minuten gefärbt und umgehend unter dem Mikroskop betrachtet. Als Gegenfärbung wurde zuvor entweder eine DAPI-Färbung (siehe Kapitel 2.7.1.1.6) oder eine Färbung mit dem sogenannten *RedoxSensor™ Green reagent* (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA USA) durchgeführt. Dabei handelt es sich um einen membrangängigen Farbstoff, welcher nach intrazellulärer Reduktion ein stabiles grünes Fluoreszenzsignal (Emission 520 nm) ausbildet. Diese Färbung wurde ebenfalls in einer Färbelösung (1 μM *RedoxSensor Green* in ES-Medium) für 10 min durchgeführt.

2.7.2 Optische Kohärenztomographie

Bei der optischen Kohärenztomographie (OCT – *optical coherence tomography*) handelt es sich um ein bildgebendes Verfahren mit dessen Hilfe dreidimensionale Aufnahmen von Biofilmen generiert werden können. Hierbei emittiert eine Lichtquelle breitbandiges Licht mit zeitlich geringer Kohärenzlänge. Dieses wird durch einen Strahlteiler zum einen auf das zu untersuchende Objekt und zum anderen auf einen Spiegel in einem Referenzarm geleitet und zurückreflektiert. Bei einer Streuung oder Reflektion des Lichtes durch die zu untersuchende Biofilmprobe werden der Probenstrahl und der Referenzstrahl im Detektorarm überlagert. Dieses Interferenzsignal wird von einem Detektor aufgezeichnet. Die Verschiebung des Spiegels im Referenzarm erlaubt einen axialen Scan durch die

Biofilmprobe. Durch laterale Verschiebung des gesamten OCT-Messkopfes können so dreidimensionale Aufnahme des Biofilms *in silico* generiert werden.

Die OCT-Aufnahmen der kathodischen Biofilme wurden in der Arbeitsgruppe Horn des Engler-Bunte-Instituts durchgeführt (Ganymede II - LSM04, Thorlabs, Dachau). Die OCT-Probenkopfhalterung wurde fest an der Fließzellenperipherie verschraubt. Dies ermöglicht räumlich reproduzierbare Aufnahmen des Biofilms zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Auflösung entsprach 12 µm pro Pixel. Die visualisierte Stelle (8 mm × 4 mm) befand sich 50 mm unterhalb des Einflusses der Fließzelle.

2.8 Molekularbiologische Methoden

2.8.1 DNA-Amplifikation

Die in dieser Arbeit verwendeten 16S-DNA-Fragmente wurden mittels PCR (*Polymerase Chain Reaction*) amplifiziert. Bei dieser Methode wird ein durch zwei Primer eingegrenzter Bereich eines DNA-Stranges *in vitro* amplifiziert. Als Primer dienten zum Template komplementäre Oligonukleotide (Sigma-Aldrich, Steinheim). Diese sind in Tab. 28 aufgeführt.

Tab. 28: In dieser Arbeit verwendete Primer und ihre Sequenz in 5'-3' Richtung.

#	Name	Sequenz (5'-3')
1	Archaea_21F	TTCCGGTTGATCCYGCCGGA
2	Bacteria_27F	GAGTTTGATCCTGGCTCA
3	Universal_R_1492	GGTTACCTTGTACGACTT

Aufgereinigte DNA (siehe 2.8.3) oder eine Einzelkolonie dienten als *Template*. Für analytische Zwecke wurde der „ready to use“-MangoMix von Bioline (Luckenwalde) verwendet. Dieser enthält bis auf die beiden Primer und das Template sämtliche für die PCR-Reaktion notwendigen Reagenzien. Als Polymerase dient hier eine modifizierte Form der Taq-Polymerase. Auch der für die gelelektrophoretische Aufreinigung verwendete Ladepuffer (siehe 2.8.3) ist in dieser gebrauchsfertigen Lösung bereits enthalten. Für präparative Amplifizierungen wurde die *iProof Polymerase* (Biorad, München) mit *Proofreading*-Funktion verwendet. In der folgenden Tab. 29 sind die Standardansätze für analytische und präparative PCRs aufgelistet:

Tab. 29: Thermocycler-Standard-Programme für analytische und präperative PCR.

Analytische PCR (Mango-Mix)	Präparative PCR (iProof)
10 µl BiolineMix	10 µl 5x iProof-Puffer
5 µl forward Primer (2 pmol/µl)	1 µl iProof
5 µl reverse Primer (2 pmol/µl)	1 µl dNTPs
1 µl genomische DNA oder Kolonie	1,5 µl DMSO
	11,5 µl H ₂ O
	12,5 µl forward Primer
	12,5 µl reverse Primer
	1 µl genomische DNA oder Kolonie

Als Thermocycler dienten die Modelle C1000 und S1000 sowie ein MJMini (Bio-RAD, München). Die verwendeten Protokolle sind in Tab. 30 beschrieben. Für Primer mit bis zu 30 Basenpaaren Länge wurde eine *Annealing*-Zeit von 30 Sekunden, für alle längeren Primer, an welche zusätzliche Überhänge angehängt waren, eine *Annealing*-Zeit von 45 Sekunden gewählt. Die Elongationszeit wurde an die erwartete Produktlänge angepasst. Nach Abschluss der präparativen PCR wurde der Ansatz entweder bei -20° C eingefroren oder mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

Tab. 30: Standartansätze für analytische und präperative PCR.

	Mango-Mix		iProof		
	Temperatur	Dauer	Temperatur	Dauer	
Initiale Denaturierung	95 °C	2:30 min	95 °C	2:30 min	
Denaturierung	95 °C	0:30 min	95 °C	0:10 min	} x 35
Annealing der Primer	55 °C	0:30 min	55 °C	0:30 min	
Elongation	72 °C	1 min/kB	72 °C	0:30 min/kB	
Finale Elongation	72 °C	10:00 min	72 °C	10:00 min	
Kühlen	12 °C	unendlich	12 °C	unendlich	

2.8.2 DNA-Quantifizierung

Zur standardmäßigen Konzentrationsbestimmung einer DNA-Probe wurde ein NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometer (ThermoScientific, Waltham, MA USA) verwendet. Die Konzentration wurde mit Hilfe der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Die für die Genomsequenzierung isolierte genomische DNA von *K. spormannii* wurde zusätzlich mit Hilfe des *Qubit Assay Kits* von ThermoScientific (Waltham, MA USA) bestimmt. Insbesondere für die SMRT-Sequenzierung ist die Konzentration der doppelsträngig vorliegenden DNA von Interesse. Daher wurde die Konzentration der isolierten DNA mit

dem *Qubit dsDNA HS Assay Kit* bestimmt, hiermit kann spezifisch doppelsträngige DNA gefärbt und anhand der Fluoreszenzintensität quantifiziert werden. Die Fluoreszenz wurde in einer 96-Well Platte mit Hilfe eines Plate Readers (TECAN Infinite m200 Pro, Tecan Trading AG, Schweiz) bestimmt.

2.8.3 DNA-Isolierung und Aufreinigung

Die Isolation bakterieller, genomischer DNA (als Template für eine PCR-Amplifikation – siehe Kapitel 2.8.1 und als Ausgangsmaterial für die Illumina MiSeq PE250 Sequenzierung – siehe Kap. 2.8.5) wurde mit Hilfe des *innuSPEED Soil DNA Kit* von analytikjena (Jena) durchgeführt. Hierbei wurden 900 µl Flüssigkultur anstelle einer Bodenprobe verwendet. Die DNA-Isolation von Kathoden wurde ebenfalls mit dem oben genannten Kit durchgeführt. Dabei wurde ein 1 cm² großes Stück Graphitvlies anstelle der Bodenprobe eingesetzt. Die Aufreinigung wurde nach vorgeschriebenem Protokoll durchgeführt. Lediglich für den mechanischen Aufschluss wurde eine Schwingmühle (MM400, Retsch, Haan) verwendet. Die Zellen wurden für 7 min bei 30 Hz aufgeschlossen.

Die Isolierung der genomischen DNA für die PacBio SMRT Sequenzierung erfolgte mit Hilfe des *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* von Promega (Mannheim). Hierbei diente 50 ml einer heterotrophen *K. spormannii* Kultur in ihrer exponentiellen Phase als Ausgangsmaterial. Sämtliche Vortex- und Resuspendierungsschritte wurden durch vorsichtiges Invertieren substituiert, um Doppelstrangbrüche in der isolierten DNA zu vermeiden. Eluiert wurde die DNA schließlich bei Raumtemperatur über Nacht in 100 µl Elutionspuffer-Puffer (siehe Tab. 31).

Tab. 31: Grundrezept für einen Liter Elutionspuffer (TE). Der pH Wert wurde mit HCl auf einen Wert von 8,0 eingestellt.

<i>Elutionspuffer (TE)</i>	
Substanz	Einwaage
TRIS	4,84 g
EDTA	292 mg

Um DNA-Fragmente der Größe nach aufzutrennen, wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Hierbei wandert die negativ geladene DNA in einem elektrischen Feld von 120 V zur positiv geladenen Anode. Die Laufgeschwindigkeit eines Moleküls wird neben dessen Größe auch durch den Salzgehalt des Puffers und durch die Beschaffenheit der

Gelmatrix bestimmt. Für die Gelherstellung wurde 1 % Agarose (w/v) in 1x TAE-Puffer (siehe Tab. 32) aufgekocht, bis diese sich vollständig gelöst hat. Nach kurzem Abkühlen wurde 1 µl Midori Green DNA Stain (NIPPON Genetics, Dueren) pro 10 ml Agaroselösung hinzugefügt und diese in eine Gelkammer mit eingesetztem Taschenformer gegossen. Nach der Polymerisation wurde das Gel in einer Laufkammer mit 1x TAE Puffer überschichtet und anschließend mit den DNA-Proben sowie 6 µl GeneRuler™ 1kb DNA LADDER (Fermentas, St. Leon-Rot) beladen. Um die Lauffront der DNA-Proben sichtbar zu machen und um diese zu beschweren, wurden vor dem Beladen zu je 50 µl Probe 10 µl 6x DNA-Ladepuffer (*Gel Loading Dye Blue 6x*, NEB, Frankfurt am Main) zugegeben. Die Banden wurden entweder mit einer UV-Durchlichtlampe (IL 200M, Bachhofer, Reutlingen) bei einer Wellenlänge von 312 nm oder mit dem ChemiDoc™ XRS+ System detektiert. Einzelne Banden wurden zu präparativen Zwecken mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit dem *Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega, Mannheim) aufgereinigt.

Tab. 32: Bestandteile des 50x TAE-Puffers.

50x TAE
2 M Tris/HCl pH 8
1 M Essigsäure
100 mM EDTA

2.8.4 RNA-Isolierung und Aufreinigung

Die für die vergleichende Transkriptomanalyse (siehe Kapitel 2.9.5) verwendeten RNA-Proben wurden im Duplikat unter drei verschiedenen Wachstumsbedingungen (heterotroph, lithoautotroph, elektroautotroph) generiert. Für heterotrophe Wachstumsbedingungen wurde *K. spormannii* unter oxidischen Bedingungen und bei 60 °C in ES-Medium mit 50 mM Natriumpyruvat als alleinige Kohlenstoffquelle kultiviert. Autotrophe Zellen wurden in ES-Medium und einer H₂/CO₂/O₂-Gasphase (80:15:5, v/v/v) kultiviert. Elektroautotrophe Zellen wurden im mikrobiellen Elektrosynthesereaktor (siehe 2.4.1 und 2.5.2) kultiviert. Zur Erhöhung der Zellzahl wurde der Biofilm während des *Linear Sweeps* zunächst heterotroph in R2A_m kultiviert (3 Tage). Anschließend wurde bei Erreichen des Endpotentials (-500 mV vs. SHE) das Vollmedium durch ES-Medium ausgetauscht, um autotrophe Bedingungen zu generieren. Zur Zellernte wurden die Kathoden zunächst samt Biofilm in 15 ml Reaktionsgefäße überführt und mit 10 ml eisgekühltem *RNAprotect Bacteria*

reagent (Qiagen, Hilden) überschichtet. Anschließend wurden die Zellen durch intensives Schütteln des Reaktionsgefäßes auf einem Vortexmischer aus dem kathodischen Biofilm gelöst und das Graphitvlies aus dem Reaktionsgefäß entfernt. Zur Zellernte der heterotrophen und lithoautotrophen Kulturen wurden ebenfalls 5 ml Kultur mit 10 ml *RNAprotect* in ein 15 ml Reaktionsgefäß gegeben. Alle Zellsuspensionen wurden anschließend bei $6000 \times g$ für 10 min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Zellpellets bei -80 °C gelagert. Die eigentliche RNA-Isolation wurde durch IMGGM (Martinsried) durchgeführt. Aus je 10^8 Zellen Ausgangsmaterial wurde die gesamte RNA mithilfe des *RNeasy Micro Kits* (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben isoliert. Auf eine Ankonzentrierung der mRNA (rRNA-Depletion) wurde verzichtet. Die Integrität der isolierten RNA wurde auf einem Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA USA) überprüft.

2.8.5 Sequenzierungen

2.8.5.1 Sanger-Sequenzierung

Die Sequenzierung der amplifizierten 16S-DNA von Reinkulturen wurde mit dem *Mix2Seq Kit* der Firma MWG eurofins Genomics durchgeführt. Dabei dienten die 16S-Amplifikationsprimer als Sequenzierungsprimer der Sequenzierung nach Sanger.

2.8.5.2 Genomsequenzierung

Zur Sequenzierung der genomischen Information von *K. spormannii* wurde ein dualer Sequenzierungsansatz gewählt. Zum einen wurde das Genom mittels der *PacBio single-molecule real-time* (SMRT)-Technologie und zum anderen mit Hilfe der Illumina-Technologie sequenziert. Beide Sequenzierungen wurden außer Haus durchgeführt. So wurde die SMRT-Sequenzierung in Braunschweig durch die DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) durchgeführt. Die Illumina-Sequenzierung (*Nextera XT library preparation Kit* nach Herstellerangabe, Illumina MiSeq PE250, Illumina, Eindhoven, Niederlande) wurde hingegen bei IMGGM (IMGGM Laboratories, Planegg) durchgeführt. Die Herstellung der *PacBio SMRTbell template library* wurde leicht abgewandelt nach Herstellerangabe durchgeführt (Menlo Park, CA USA): Zur Klonierung der 15-kb *libraries* wurden 3,5 µg genomische DNA (siehe 2.8.3) über Nacht mit den Komponenten des P6 Binding Kits (Pacific Biosciences) ligiert. Anschließend wurden DNA-Fragmente mit geringer Größe (<4 kb) durch automatisierte Gelelektrophorese verworfen (BluePippin, Sage Science, Beverly, MA USA). Die anschließende Sequenzierung erfolgte auf einem PacBioRSII (240 min,

Annealing- und Reaktionstemperaturen wurden mit Hilfe des Programmes *RS Remote* bestimmt).

2.8.5.3 RNA-Sequenzierung

Die in Kapitel 2.8.4 beschriebenen RNA-Proben wurden ebenfalls durch *IMG*M (Planegg) auf einem Illumina NextSeq 500 sequenziert. Zuvor wurden die RNA-Proben der biologischen Duplikate mit dem *TruSeq Stranded Total RNA HT Kit* nach Herstellerangaben auf die Sequenzierung vorbereitet. Die Anzahl der so generierten Reads (1×75 bp) kann Tab. 33 entnommen werden.

Tab. 33: Anzahl der ungefilterten Reads resultierend aus der RNA-Sequenzierung.

Sample	Anzahl ungefilterter Reads
Heterotroph 1	21.095.927
Heterotroph 2	23.106.819
Lithoautotroph 1	24.883.935
Lithoautotroph 2	22.700.608
Elektroautotroph 1	24.737.539
Elektroautotroph 2	12.304.546

2.9 Bioinformatische Methoden

2.9.1 BLAST

Um die Ähnlichkeit einer sequenzierten 16S-rDNA mit der 16S-rDNA-Sequenz von bereits bekannten Mikroorganismen zu vergleichen wurde sowohl die NCBI-, als auch die RDP-BLAST-Suche verwendet.

2.9.2 TYGS

Die genombasierte Artabgrenzung von *K. spormannii* wurde anhand des *TYGS*-Workflows (*Typestrain Genome Server*) durchgeführt (Meier-Kolthoff & Göker, 2019). Dieser Workflow beruht auf der sogenannten *Genome BLAST Distance Phylogeny* (GBDP). Dabei handelt es sich um eine *in silico* Analyse zur Bestimmung der Ähnlichkeit zwischen mehreren Genomen. Formal handelt es sich dabei um eine spezielle Form der *BLAST*-Analyse, welche neben Sequenzhomologien jedoch auch weitere Parameter, wie zum Beispiel den GC-Gehalt der untersuchten Genome berücksichtigt. Anhand dieser Daten wurde anschließend ein

theoretischer Wert einer *in vitro* DNA-DNA-Hybridisierung mittels des sogenannten *Genome-to-Genome Distance Calculators* berechnet.

2.9.3 MEGA

Alle in dieser Arbeit gezeigten Stammbäume wurden entweder nach dem *Neighbour-Joining* (Kimura) oder nach dem *Maximum-Parsimony (subtree-pruning-regrafting)* Algorithmus in MEGA7 berechnet und erstellt (Kumar *et al.*, 2016). Dabei wurden 1000 Wiederholungen für die Berechnung der *Bootstrap*-Werte gewählt (Felsenstein, 1985). Zusätzlich wurde bei der Erstellung der Stammbäume zur phylogenetischen Untersuchung der [NiFe]-Hydrogenase aus *K. spormannii*, die Protein-, bzw. 16S-rDNA-Sequenzen aus *Cupriavidus necator* als Außengruppe gesetzt.

2.9.4 Genom-Assemblierung

Die Rohdaten der *PacBio*-Sequenzierung wurden unter Verwendung des *RS_HGAP_Assembly.3* Skriptes im *SMRT Portal* (Version 2.3.0) assembliert. Dabei wurden keine Standardparameter verändert. Der hieraus resultierende *Contig* wurde durch das *RS_Bridgemapper.1*-Tool zirkularisiert und *dnaA* als Startgen festgelegt. Zur abschließenden Fehlerkorrektur wurden die Rohdaten der Illuminasequenzierung (~1 Million Reads mit 2 × 250 bp Länge) mittels der Programme *BWA* und *VarScan* gegen das zirkuläre Genom *gemappt*. Hierdurch konnte ein QV60 des zirkulären Genoms erreicht werden. Abschließend wurde das Genom unter Verwendung der *NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline* annotiert.

2.9.5 Vergleichende Transkriptomanalyse

Zur quantitativen Auswertung der vergleichenden Transkriptomanalyse wurden die Rohdaten der RNA-Sequenzierung in die *CLC genomics workbench* (Version 11.0.2, CLC bio, Aarhus, Denmark) importiert und mit Hilfe des *RNA-seq analysis tools* unter Auswahl der „*all group pairs*“-Option prozessiert. In Tab. 39 ist der Anteil der *gemappten Reads* pro *Sample* aufgeführt. Die Kalkulation des PCA-Plots (Hauptkomponentenanalyse) wurde in der CLC Workbench durch die *PCA for RNA-seq*-Funktion unter Verwendung der Standardeinstellungen durchgeführt. Zur Berechnung der *false discovery rate-corrected p-values* (*FDR*) wurde der Wald-Test herangezogen.

2.10 Analytische Methoden

2.10.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung des Proteingehaltes der Kathoden wurde mit Hilfe der Methode nach Bradford durchgeführt. Zuvor wurden die Zellen in 200 mM NaOH-Lösung bei 95 °C und starkem Schütteln für 20 min von den Graphitfasern gelöst und hydrolysiert. Für den Test wurde eine BSA-Eichkurve in den Konzentrationen 0, 20, 40, 60, 80 und 100 µg/ml erstellt. Die zu messenden Proben wurden in verschiedenen Verdünnungen angesetzt, um den Konzentrationsbereich der Eichgerade zu treffen. Die Standards und die verdünnten Proben wurden 1:10 mit Bradfordreagenz (Tab. 34) versetzt und für 10 Minuten unter Lichtausschluss inkubiert. Hiervon wurden 200 µl der Proben in eine 96-well-Mikrotiterplatte überführt die Absorption bei 595 nm (TECAN Infinite m200 Pro, Tecan Trading AG, Schweiz) gemessen.

Tab. 34: Grundrezept für einen Liter Bradfordreagenz.

Bradfordreagenz

Substanz	Einwaage/Volumen
Coomassie-Brilliantblau G-250	100 mg
Konzentrierte Phosphorsäure	100 ml
96 % Ethanol	50 ml

2.10.2 Chemotaxonomische Untersuchungen

Die chemotaxonomischen Untersuchungen zur Charakterisierung der beiden *Kyrpidia*-Spezies wurden bei der DSMZ in Braunschweig durchgeführt. Die Generierung der Proben fand hingegen in Karlsruhe statt. Hierzu wurden *K. spormannii* EA-1^T und *K. tusciae* DSM2912^T für 48 h unter aeroben Bedingungen in je 20 Liter R2A_m-Medium kultiviert. Die Kulturen wurden anschließend bei 4 °C für 15 min bei 6000 × g abzentrifugiert und das Kulturpellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Fettsäureanalyse wurde nach Kämpfer *et al.* anhand des *Sherlock Microbial Identification Systems* (MIDI) durchgeführt (Kämpfer & Kroppenstedt, 1996). Zur Bestimmung der respiratorischen Lipoquinone und der polaren Lipide wurden die Biomasse zunächst lyophilisiert. Die polaren Lipide und die respiratorischen Quinone wurden anschließend aus 100 mg gefriergetrockneten Zellen nach Tindall extrahiert (B.J. Tindall, 1990; Tindall, 1990). Die extrahierten Lipoquinone wurden anschließend mittels Dünnschichtchromatographie in einem Silicagel (Macherey-

Nagel) aufgetrennt. Ein Hexan/Tert-butylmethylether-Gemisch (9:1, v/v) diene als Laufmittel. Banden, welche eine UV-Absorption aufwiesen, wurden aus dem Gel extrahiert (Methanol/Heptan, 9:1, v/v) und auf einer HPLC (LDC Analytical HPLC System, Thermo Separation Products) ausgestattet mit einer Reverse-Phase-Säule (Macherey-Nagel, 2125 mm, 3 µm, RP18) weiter aufgetrennt und bei einer Wellenlänge von 269 nm detektiert. Polare Lipide wurden nach Tindall *et al.* aufgetrennt und bestimmt (Tindall *et al.*, 2007). Zur Untersuchung der Peptidoglykanstruktur und der „Ganzzellzucker“ wurden zunächst zwei Ganzzellhydrolysate hergestellt. Zum einen wurde die Biomasse in 4 M HCl bei 100 °C für 16 Stunden prozessiert (Peptidoglykan-Analyse) und zum anderen wurde die Zellen in 0,5 M Schwefelsäure bei 100 °C für 2 Stunden hydrolysiert (Ganzzellzucker-Bestimmung). Die Hydrolysate wurden in einem weiteren Schritt mittels Dünnschichtchromatographie auf Zelluloseplatten aufgetrennt und nach Rhuland und Staneck charakterisiert (Rhuland *et al.*, 1955; Staneck & Roberts, 1974).

2.10.3 Biolog-Assay zur Kohlenstoffverwertung

Zur Bestimmung der Kohlenstoffverwertungsprofile von *K. spormannii* EA-1^T und *K. tusciae* DSM2912^T wurden sogenannte *Biolog PM-1 phenotyp array plates* verwendet. Dabei handelt es sich um spezielle 96-Well-Platten, die jeweils 95 unterschiedliche Kohlenstoffquellen (je eine pro Vertiefung) und ein leeres Well als negativ Kontrolle enthalten. Diese Platten wurden mit dem zu charakterisierenden Stamm beimpft und mit einem speziellen Farbstoff (*Dye Mix F* in dieser Arbeit) versetzt. Bei Verwertung der Kohlenstoffquelle ist ein Farbumschlag des Mediums detektierbar. Der Assay wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, lediglich das Minimalmedium IF-0 wurde durch ES-Medium (100 µl pro Well) ersetzt und die Platten im Triplikat bei 60 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Im Folgenden sind alle getesteten Kohlenstoffquellen aufgelistet: *L-Arabinose*, *N-Acetyl-D-Glucosamin*, *D-Glucarsäure*, *Bernsteinsäure*, *D-Galactose*, *L-Asparaginsäure*, *L-Prolin*, *D-Alanin*, *D-Trehalose*, *D-Mannose*, *Galaktit*, *D-Serin*, *D-Sorbitol*, *Glycerol*, *L-Fructose*, *D-Glucuronsäure*, *D-Gluconsäure*, *α-Glycerolphosphat*, *D-Xylose*, *L-Milchsäure*, *Ameisensäure*, *D-Mannitol*, *Glutamsäure*, *D-Glukose-6-Phosphat*, *D-Galaktonsäure-δ-Lacton*, *Äpfelsäure*, *D-Ribose*, *Tween 20*, *L-Rhamnose*, *D-Fruktose*, *Essigsäure*, *D-Glukose*, *Maltose*, *D-Melibiose*, *Thymidin*, *L-Asparagin*, *D-Asparaginsäure*, *D-Glukosaminsäure*, *1,2-Propandiol*, *Tween 40*, *α-Keto-Glutarsäure*, *α-Keto-Buttersäure*, *α-Methyl-D-Galactosid*, *D-Milchsäure*, *Laktulose*, *Sukrose*, *Uridin*, *Adenosin*, *2-Deoxyadenosin*, *Maltotriose*, *Adonitol*, *β-Methyl-D-Glucosid*, *α-Hydroxy-Buttersäure*, *α-hydroxyglutarsäure-δ-Lacton*, *Tween 80*, *D-Fructose-6-Phosphat*,

D-Glukose-1-Phosphat, M-Tartarsäure, L-Glutamin, Glycyl-L-Asparaginsäure, Zitronensäure, M-Inositol, D-Threonin, Fumarsäure, Bromo-Bernsteinsäure, Proptionsäure, Mucinsäure, Glycolsäure, Glyoxylsäure, D-Cellobiose, Inosine, L-Äpfelsäure, D-Äpfelsäure, Methylbernsteinsäure, Monomethylbernsteinsäure, N-Acetyl-β-D-Mannosamin, Acetoacetat, L-Alanylglycin, L-Alanin, L-Theronin, L-Serin, Tricarballysäure, Glycyl-L-Glutarsäure, Glycyl-L-Prolin, p-Hydroxyphenylelessigsäure, m-Hydroxyphenylelessigsäure, Tyramin, D-Psicose, L-Lyxose, Glucuronamid, Bernsteinsäure, L-Galactonsäure-δ-Lacton, D-Galacturonsäure, Phenylethylamin, 2-Aminoethanol.

2.10.4 ¹³C-Inkorporations-Experiment

Zum Nachweis der CO₂-Fixierung durch einen kathodischen *K. spormannii* Biofilm, wurde ein Kohlenstoffisotopenexperiment durchgeführt (Schematische Übersicht des experimentellen Verlaufes kann Abb. 26 entnommen werden). Als Fließzellinokulum diente eine autotroph gewachsene *K. spormannii* Kultur, deren Biomasse ein stark erhöhtes ¹³C/¹²C-Verhältnis aufwies. So diente ¹³CO₂ als alleinige Kohlenstoffquelle dieser Vorkultur. Hierfür wurde ein 50 ml Reaktionsgefäß, gefüllt mit 1g NaH¹³CO₃, in einer 2 l Kulturflasche mittels einer Drahtkonstruktion am Gummistopfen des gasdichten Verschlusses befestigt. Die Kulturflaschen enthielten 350 ml ES-Medium und wurden mit 2 ml autotropher Kultur beimpft. Anschließend wurden die Flaschen vakuumisiert und 20 ml 1 M HCl mittels Kanüle langsam durch den Gummistopfen in das Reaktionsgefäß in der Kulturflasche überführt. Durch den säuregetriebenen Zerfall des Natriumcarbonats konnte so die Gasphase der Kulturflaschen mit ¹³CO₂ gefüllt werden. Darauf wurde die Gasphase durch einen Sterilfilter mit Wasserstoff auf 1 bar bedruckt und anschließend 100 ml Luft mittels Spritze als Sauerstoffquelle hinzugefügt. Bei einer optischen Dichte (600 nm) von 0,1 wurden die Zellen mittels Zentrifugation geerntet und zweimal mit sterilem ES-Medium gewaschen. Die eine Hälfte der Kultur wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren, die andere Hälfte diente als Inokulum einer bioelektrochemischen Fließzelle. Die finale OD₆₀₀ in der Fließzelle entsprach 0,05. Die genauen Kultivierungsbedingungen in der Fließzelle sind Kapitel 2.4.2 und 2.5.2 zu entnehmen. Nach zehn Tagen wurde die Fließzelle von der Peripherie entkoppelt und der kathodische Biofilm in 50 ml ES-Medium suspendiert, zweimal in sterilem ES-Medium gewaschen und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Alle Proben wurden anschließend über Nacht lyophilisiert. Das ¹³C/¹²C-Isotopenverhältnis der gefriergetrockneten Biomasse (die Trockenmasse der Proben betrug 5 mg (Inokulum) und

15 mg (Biofilm)) wurde anschließend durch das Zentrum für stabile Isotopen-Forschung der Universität Göttingen auf einem Amy – Delta C Elementar analyzer (Conflo III) bestimmt.

2.10.5 Eisenkorrosionsexperiment

In diesem Experiment sollten die korrosiven Eigenschaften von *K. spormannii* gegenüber elementarem Eisen untersucht werden, um Rückschlüsse auf potenzielle Elektronenaufnahmemechanismen von einer Kathode zu erlangen. Als Negativkontrolle wurde *K. tusciae* gewählt. *Methanococcus maripaludis* diente als Positivkontrolle. Zunächst wurden je 0,77 g Eisen(0)-Granula (0,5-1,5 μM , 99,97 % Reinheit, ChemPur, Karlsruhe) in 100 ml Laborgewindeflaschen mit gasdichtem Schraubverschluss und Gummistopfen eingewogen. Anschließend wurde die Gasphase über 25 min „anaerobisiert“ (Zyklische Behandlung durch einminütige Begasung mit Stickstoff, gefolgt von einminütigem Vakuumisieren). In einem weiteren Schritt wurde die Stickstoffgasphase durch eine N_2/CO_2 (80:20, v/v) Atmosphäre getauscht und die Kulturgefäße (ohne Medium, jedoch mit Eisen-Granula und anaerober Atmosphäre) autoklaviert. Die Inokula wurden wie folgt vorbereitet: Autotrophe Kulturen aller verwendeten Organismen wurden zunächst für mindestens 30 Minuten mit N_2/CO_2 (80:20, v/v) begast, um Wasserstoff und Sauerstoffrückstände aus den Kulturen zu entfernen. Zur weiteren Sauerstoffeliminierung wurden dem Medium 1,65 ml Cystein-HCl (8g in 75 ml) und 0,95 ml 1 M NaOH (anaerob) je 400 ml Medium hinzugefügt. Anschließend wurden die vorbereiteten Kulturflaschen mit je 25 ml Kultur beimpft. Als weitere Negativkontrolle wurde ein Teil der Kultur bei 100 °C für eine Stunde sterilisiert. Zur Inokulation der Eisengranula mit Zellüberstand wurden die Vorkulturen durch zwei aufeinander geschraubte Sterilfilter (0,2 μm Porengröße, Sarstedt) filtriert. Die Kulturflaschen mit den inokulierten Eisengranula wurden anschließend bei 60 °C (*Kyrpidia*-Spezies) bzw. 30 °C (*M. maripaludis*) ohne Schütteln inkubiert. Die Gaszusammensetzung der Gasphase wurde anschließend nach einer Woche mittels Gaschromatographie bestimmt. In dieser Arbeit kam ein Agilent 490 Mikro Gaschromatograph ausgestattet mit einer Molekularsiebsäule 5A PLOT (MS5A, 0,25 mm ID, 10 m, 45 °C) und einer PoraPLOT U PLOT Säule (PPQ, 0,25 mm ID, 10 m, 110 °C) zum Einsatz (Teckso, Neukirchen-Vluyn). Die Detektion der Gase erfolgte mit einem Mikro-Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD). Als Trägergas diente Helium 5.0 und Argon 5.0 der Firma Basi Schöberl GmbH & Co. KG in Rastatt. Die Pumpzeit der integrierten Membranpumpe betrug 15 Sekunden. Die Laborglasflaschen mit den Eisengranula wurden über Kanülen direkt an den Gaschromatographen angeschlossen. Zur Kalibration wurden definierte Gasgemische (CH_4 , CO_2 , H_2 , N_2 , O_2 , N_2O) der Firma Air liquide

(Paris, Frankreich) bereitgestellt. Die Auswertung und Kalibration erfolgte mittels *OpenLAB CDS EZChrom Compact Tool* (Agilent, Santa Clara, USA).

2.10.6 HPLC (High-Performance-Liquid-Chromatography)

Die HPLC ist eine analytische Methode, mit der man Substanzen trennen und über Standards identifizieren und quantifizieren kann. Es handelt sich um ein chromatographisches Trennverfahren, bei dem die zu untersuchende Substanz zusammen mit einem Laufmittel durch eine Trennsäule gepumpt wird, welche eine stationäre Phase enthält. Verschiedene Moleküle in der zu untersuchenden Substanz wechselwirken unterschiedlich stark mit der stationären Phase und erscheinen daher zu verschiedenen Zeiten (Retentionszeiten) am Ende der Trennsäule, wo sie mit einem geeigneten Detektor nachgewiesen werden können. In dieser Arbeit wurde mit einem DAD (Dioden-Array-Detektor) gearbeitet, der bei geeigneter Säulenwahl eine Analyse organischer Säuren erlaubt. Als Säule diente eine 300 × 7,8 mm Aminex HPX-87H Säule (Bio-Rad, München), welche mit der Hitachi LaChrom Elite HPLC Anlage betrieben wurde. Als Flussmittel diente 5 mM H₂SO₄ mit einer Flussrate von 0,6 ml/min. 100 µl der zuvor filtrierten Proben (0,2 µm Porendurchmesser) wurden mit 10 µl 0,5 M H₂SO₄ angesäuert und diese anschließend auf die Säule injiziert. Die Detektion der organischen Säuren erfolgte bei 210 nm mit einem Hitachi Diode Array UV Detector L 2455; der Auswertung des Chromatogramms diente die *EZChrom Elite Software*.

III. ERGEBNISSE

3.1 Isolierung mesophiler Knallgasbakterien

In der dieser Arbeit vorangegangenen Masterarbeit konnten verschiedene mesophile, lithoautotrophe Organismen aus kathodischen Biofilmen angereichert werden. Hierzu wurden drei mikrobielle Elektrosynthesereaktoren mit unterschiedlichen Umweltproben inokuliert und über mehrere Monate hinweg bei 30 °C inkubiert. Anschließend dienten Fragmente der Kathodenvliese aus den mikrobiellen Elektrosynthesereaktoren als Inokulum für verschiedene Flüssigmedien. Auf die Zugabe organischer Kohlenstoffquellen wurde verzichtet. So stellte Kohlenstoffdioxid in der Gasphase der gasdicht verschlossenen Kultivierungsgefäße die alleinige Kohlenstoffquelle dieser Anreicherungen dar. Als Elektronendonator wurde in allen Anreicherungen Wasserstoff gewählt, wohingegen sich die

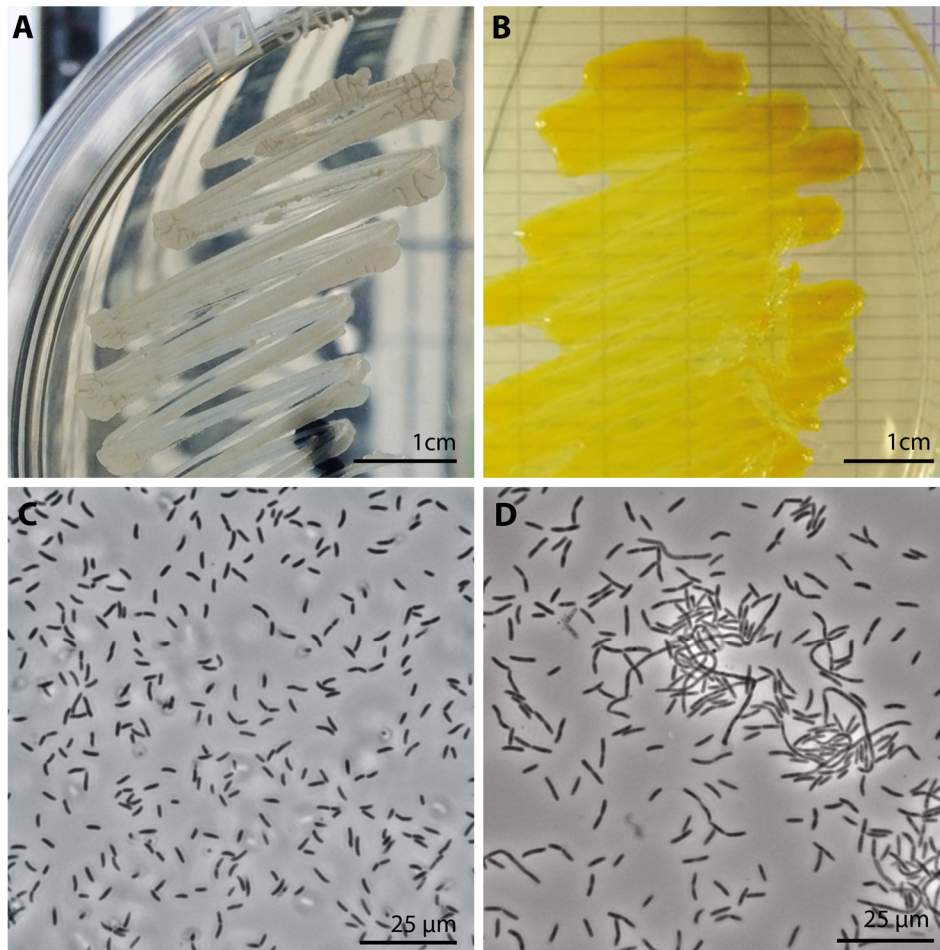


Abb. 8: Makro- und mikroskopische Morphologie der beiden mesophilen Isolate. A, C. Isolat aus *Pseudomonas*-Anreicherung; B, D. Isolat aus *Hydrogenophaga*-Anreicherung.

verschiedenen Medien hinsichtlich des verfügbaren terminalen Elektronenakzeptors unterschieden. Insbesondere in zwei Anreicherungsansätzen, welchen Sauerstoff als Elektronenakzeptor hinzugefügt worden war, konnte deutliches autotrophes Wachstum detektiert werden. Nach fünfmaligem Überführen wurden diese Anreicherungskulturen mittels einer 16S-Amplikonsequenzierung phylogenetisch untersucht. Eine Kultur wurde von Organismen der Gattung *Pseudomonas*, die andere von Organismen der Gattung *Hydrogenophaga* dominiert. In der vorliegenden Arbeit sollten diese Hauptvertreter in Reinkultur gebracht werden. Durch mehrmaliges Ausplattieren mittels Vereinzelungsausstrichen auf Agaroseplatten, welche in einer H₂/O₂/CO₂-Atmosphäre inkubiert wurden, konnten zwei Knallgas-Isolate mit distinkter Morphologie vereinzelt werden (siehe Abbildung 6). Das Isolat aus der *Pseudomonas*-Anreicherung ist gekennzeichnet durch eine leicht gekrümmte Stäbchenform mit einer Länge von 3 - 7 µm und bildet elfenbeinweiße, durchscheinende Kolonien aus. Die Kolonien des *Hydrogenophaga*-Isolates hingegen sind von intensiver gelber Färbung bestimmt. Bei Vergrößerung im Phasenkontrast zeigen sich Einschlüsse unbekannter Granula in den 4 - 8 µm langen Stäbchen, welche häufig kettenförmig auftreten. Um die Reinheit der Isolate zu bestätigen und Informationen über deren phylogenetische Zugehörigkeit zu erlangen, wurde deren 16S rDNA mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Die vollständigen Sequenzen können dem Appendix auf Seite 135 entnommen werden. Durch eine BLAST-Analyse konnte die Zugehörigkeit der Isolate zu den Gattungen *Pseudomonas* und *Hydrogenophaga* bestätigt werden (siehe Tab. 35). Während hierdurch die Art-Zugehörigkeit des *Pseudomonas*-Isolates mit hoher Wahrscheinlichkeit geklärt werden konnte (*P. stutzeri*), kann die genaue Art des *Hydrogenophaga*-Isolats anhand der 16S-Sequenz nicht eindeutig bestimmt werden. Die höchste Sequenzidentität besteht zur Art *Hydrogenophaga pseudoflava*.

Tab. 35: BLAST-Analyse der amplifizierten 16S rRNA-Gensequenzen. Zur Übersicht wurden lediglich die fünf ersten Treffer aufgeführt. Sequenzen unkultivierter Mikroorganismen wurden aus der Referenzdatenbank ausgeschlossen.

Organismus	Isolat aus <i>Pseudomonas</i> -Anreicherung			Isolat aus <i>Hydrogenophaga</i> -Anreicherung			
	Query Cover	E value	Identity	Query Cover	E value	Identity	
<i>Pseudomonas stutzeri</i> PheN2	100 %	0,0	99,93 %	<i>Hydrogenophaga pseudoflava</i> DSM 1084	100 %	0,0	100 %
<i>Pseudomonas stutzeri</i> DSM 4166	100 %	0,0	99,28 %	<i>Hydrogenophaga pseudoflava</i> GA3	99 %	0,0	99,67 %
<i>Pseudomonas stutzeri</i> NCTC10450	100 %	0,0	99,28 %	<i>Hydrogenophaga flava</i> DSM 619	99 %	0,0	99,01 %
<i>Pseudomonas stutzeri</i> 1W1	100 %	0,0	99,28 %	<i>Hydrogenophaga bisanensis</i> K102	97 %	0,0	99,06 %
<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501	100 %	0,0	99,28 %	<i>Hydrogenophaga laconesensis</i> HWB-10	99 %	0,0	97,88 %

3.2 Screening der Isolate im bioelektrochemischen System

Die in Reinkultur gebrachten mesophilen Knallgas-Isolate sollten nun gemeinsam mit dem thermophilen *Kyrpidia*-Isolat, welches ebenfalls in der oben genannten Masterarbeit als Knallgas-Bakterium aus einer thermophilen kathodischen Anreicherung isoliert wurde, einem Screening in Elektrosynthesereaktoren unterzogen werden. Dabei sollte die durch die Reinkulturen katalysierte Elektronenaufnahme im bioelektrochemischen System sowie die kathodische Biomasse nach elftägiger Inkubation bestimmt werden. Alle Elektrosynthesereaktoren wurden kontinuierlich mit einem CO_2/O_2 -Gasgemisch (99,5:0,5, v/v) durchspült. Kohlenstoffdioxid stellte die einzige Kohlenstoffquelle im System dar, die Kathode diente als alleiniger Elektronendonator. Die verwendeten Minimalmedien sowie die Inkubationstemperaturen wurden den optimalen Wachstumsbedingungen der drei Knallgasisolate angepasst. Während *Hydrogenophaga* sp. und *Pseudomonas* sp. bei 30 °C in sogenanntem *Hydrogenophaga*-Medium (pH 7,0) kultiviert wurden, betrug die Inkubationstemperatur des für das thermophile *Kyrpidia*-Isolat verwendeten ES-Mediums (pH 3,5) 60 °C. Abb. 9A,C,E zeigt die chronoamperometrisch gemessenen Stromdichten innokulierter und abiotischer Elektrosynthesereaktoren bei einem konstanten, kathodischen Potential von -500 mV vs. SHE über einen Zeitraum von elf Tagen. Für die beiden mesophilen Isolate konnte im Vergleich zu einem abiotischen Kontrollreaktor bei dem gewähltem Potential keine Änderung der elektrokatalytischen Eigenschaften der Arbeitselektrode detektiert werden. So konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen beimpftem System und der abiotischen Medienkontrolle bezüglich des Stromverbrauches über die Zeit gemessen werden. Die Stromdichte betrug in allen mesophilen Systemen konstant ca. $-3 \mu\text{A cm}^{-2}$. Im Gegensatz dazu konnten in einem mikrobiellen Elektrosynthesereaktor, welcher mit einer Reinkultur des *Kyrpidia*-Isolates inokuliert wurde, steigende reduktive Stromdichten von über $-50 \mu\text{A cm}^{-2}$ erreicht werden. Das abiotische Kontrollsystem zeigte lediglich einen stabilen Stromverbrauch von ca. $-15 \mu\text{A cm}^{-2}$. Neben den chronoamperometrischen Messungen wurden zusätzlich lineare Voltammetrie-Diagramme der inokulierten Elektrosynthesereaktoren über einen Potentialbereich von 0 mV bis -500 mV vs. SHE aufgenommen (siehe Abb. 9B,D,F). Die mesophilen Systeme sind auch hier von einem geringen Stromverbrauch über den abgebildeten Potentialbereich bestimmt. Nach einer anfänglichen Polarisierungsphase fiel die Stromdichte bei einem Potential von -250 mV auf ca. $-3 \mu\text{A cm}^{-2}$, um dann anschließend auf ungefähr $-5 \mu\text{A cm}^{-2}$ abzufallen (Abb. 9B,D). Der mit dem *Kyrpidia*-Isolat inokulierte Reaktor zeigt deutlich zunehmende Stromdichten mit fallendem Kathodenpotential. Darüber hinaus ist bei einem

Potential von ca. -400 mV ein Anstieg der negativen Steigung der linear fallenden Stromdichte zu beobachten (siehe Abb. 9F).

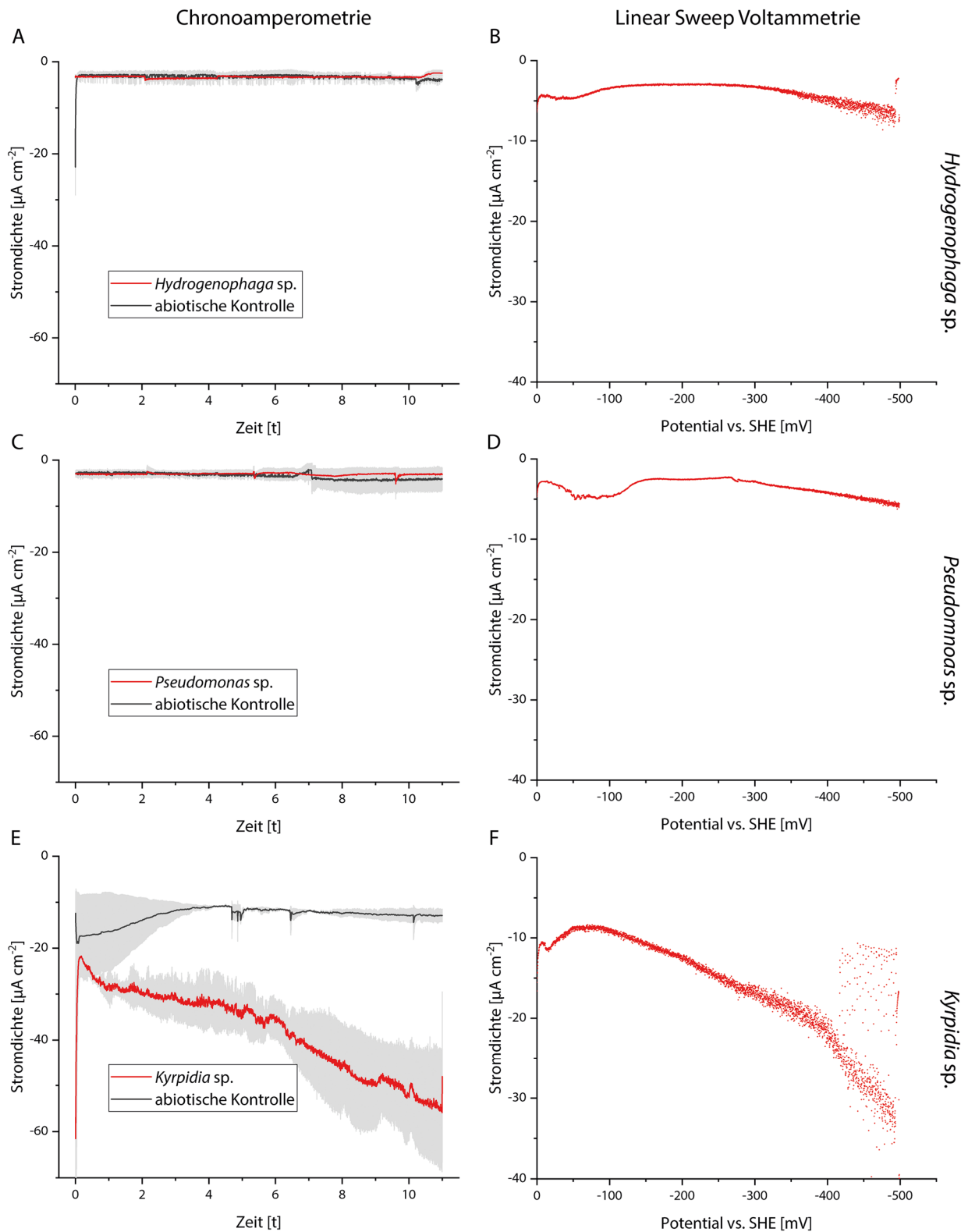


Abb. 9: Bioelektrochemisches Screening der Knallgas-Isolate. A, C, E. Chronoamperometrische Untersuchungen der Knallgas-Isolate bei einem Potential von -500 mV vs. SHE. B, D, F. Lineare Voltammetrie von 0 bis -500 mV vs. SHE über einen Zeitraum von 72 h (entspricht einer sweep rate von 5,8 $\mu\text{V/s}$).

Zur Quantifizierung der Biomasse der kathodischen Biofilme, wurde nach der elftägigen Chronoamperometrie eine modifizierte Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Hierzu wurde die kathodische Biomasse mit Hilfe von Natriumhydroxid von einem Kathodenstück definierter Größe hydrolysiert und anschließend der Proteingehalt im Hydrolysat gemessen. Als Kontrolle dienten jeweils Kathoden aus beimpften Elektrosynthesereaktoren, welche jedoch nicht mit einem konstanten Potential beaufschlagt wurden (OCP-Kontrollen).

Diese Kontrollkathoden können nicht als Elektronenquelle für elektroautotrophes Wachstum fungieren, da bei der Messung der Leerlaufspannung (*Open circuit potential*) auf Grund eines extrem hohen internen Widerstandes des Potentiostaten kein elektrischer Strom zwischen den Arbeitselektroden fließen kann.

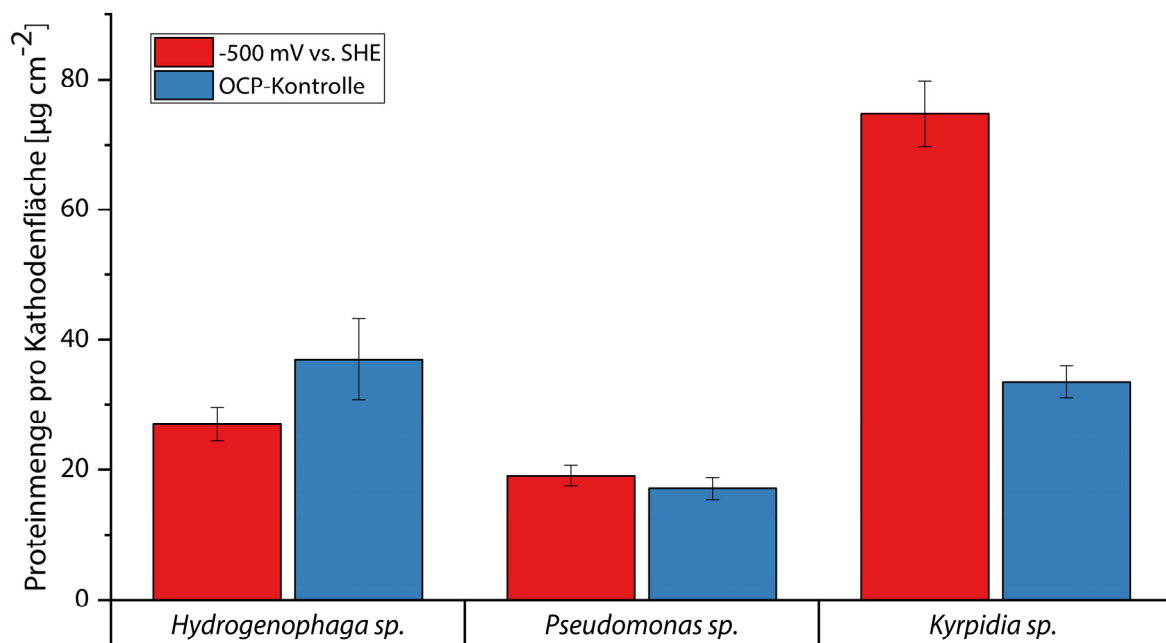


Abb. 10: Proteinbestimmung nach Bradford der basisch hydrolysierten, kathodischen Biofilme.

Die gemessenen Proteinkonzentrationen der kathodischen Biofilme wurden auf die Kathodenfläche normalisiert und sind in Abb. 10 graphisch dargestellt. Sowohl für *Hydrogenophaga sp.* als auch für *Pseudomonas sp.* zeigt die Polarisierung der Arbeitselektrode keinen signifikanten Einfluss auf die nachgewiesene Proteinmenge. Allerdings konnte im Hydrolysat des Biofilms der mit Potential beaufschlagten Kathode aus einem mit *Kyrpidia sp.* inokulierten Reaktor mehr als die doppelte Menge Protein nachgewiesen werden (ca. 80 µg cm⁻²), als im Biofilmshydrolysat der OCP-Kontrollkathode zu finden war (ca. 30 µg cm⁻²).

3.3 Genomsequenzierung des *Kyrpidia*-Isolates

Während des initialen Screenings konnten keine Hinweise auf ein elektroautotrophes Wachstum der mesophilen Isolate erlangt werden. So wiesen lediglich die mit einer Reinkultur des *Kyrpidia*-Isolates inokulierten bioelektrochemischen Systeme eine im Vergleich zur abiotischen Medienkontrolle erhöhte kathodische Elektronenabgabe auf. Gleichzeitig handelte es sich bei *Kyrpidia* sp. um das einzige getestete Isolat, bei welchem die Proteinmenge auf einer mit Potential beaufschlagten Kathode signifikant erhöht war, verglichen mit dem Proteingehalt einer OCP-Kontrollkathode. Daher sollte sich der folgende Teil der Arbeit der weiteren Untersuchung und Charakterisierung des thermophilen Isolates widmen und die Eignung dieses Organismus als Biokatalysator in einem oxischen, mikrobiellen Elektrosyntheseprozess evaluiert werden.

Zu Beginn der Charakterisierungsarbeiten wurde zunächst das Genom von *Kyrpidia* sp. sequenziert. Dies sollte zum einen als Grundlage für folgende Analysen dienen, zum anderen aber auch zur Artabgrenzung herangezogen werden. Für die Genomsequenzierung wurde ein dualer Sequenzierungsansatz gewählt, welcher die Vorteile zweier unterschiedlicher NGS-Methoden (*next generation sequencing*) miteinander kombiniert: Zunächst wurde eine sogenannte PacBio-SMRT-Sequenzierung (*Pacific Biosciences - single-molecule real-time*) durchgeführt. Mithilfe dieser Sequenzierungsmethode können bis zu 15.000 bp lange *Reads* generiert werden, welche jedoch eine sehr hohe Fehlerrate aufweisen. Die große Länge der *Reads* ermöglicht eine schnelle Assemblierung eines geschlossenen Genoms, gleichwohl mit einer hohen Fehlerrate. In einem zweiten Schritt werden die für eine alleinige Assemblierung meist zu kurzen, jedoch durch eine geringe Fehlerrate charakterisierten *Reads* einer zweiten, sogenannten Shotgun-Sequenzierung gegen das geschlossene Genom gemappt und hierdurch die Fehlerrate des assemblierten Genoms deutlich verringert. Die zweite Sequenzierung wurde in dieser Arbeit auf einem Illumina MiSeq PE250 Gerät durchgeführt. Tab. 36 stellt die Rohdaten der beiden angewandten Sequenzierungen gegenüber.

Tab. 36: Statistiken über die Rohdaten der Genomsequenzierungen.

Ergebnisse der Sequenzierungen		
	SMRT PacBio	Illumina MiSeq PE250
Anzahl Reads	50.004	183.645
Durchschnittliche Readlänge	10.632 bp	248 bp
Durchschnittliche Fehlerrate pro Read	14,5 %	0,02 %

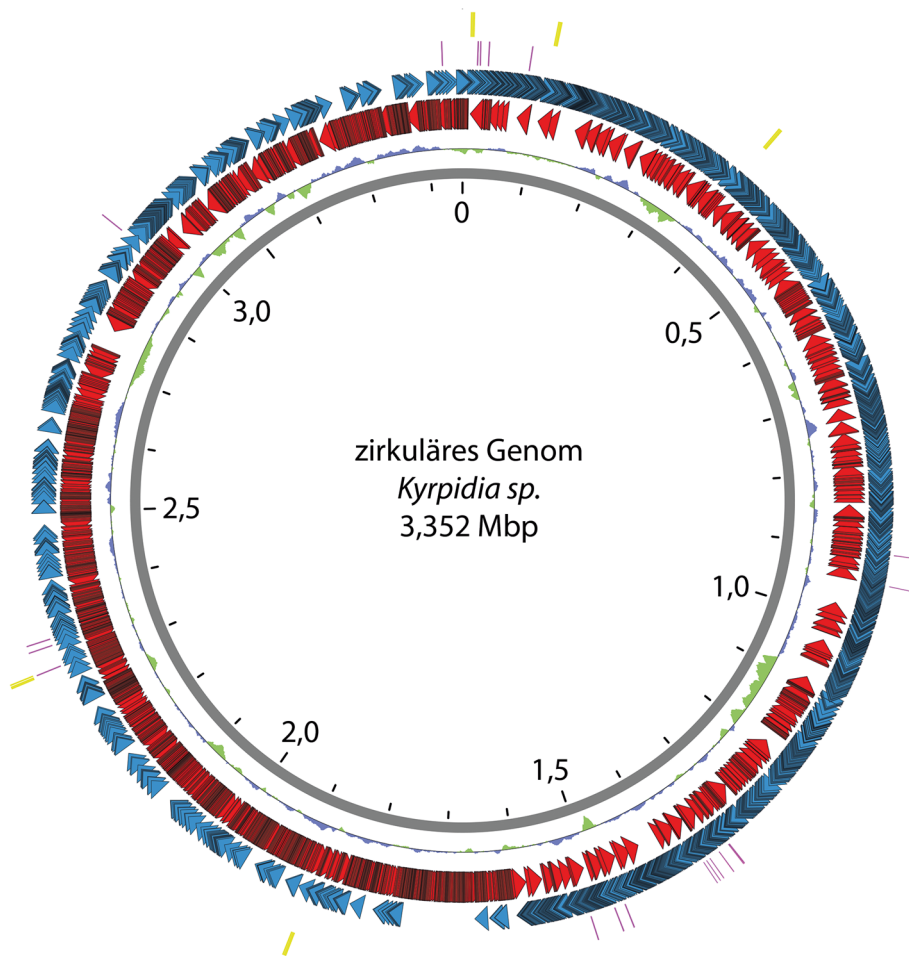


Abb. 11: Übersichtsgenomkarte des assemblierten, geschlossenen Genoms. Rote und blaue Pfeile entsprechen codierenden Bereichen. Gelbe Markierungen wurden für rRNA-Gencluster gesetzt, rosa Markierungen stehen für tRNAs. Der grün/violette Graph (zweiter Ring von innen) gibt den relativen GC-Gehalt an (%GC_{max} = 1, %GC_{min} = -1).

Die Assemblierung der Rohdaten resultierte in einem singulären, zirkulären Chromosom mit einer Fehlerrate von unter 0,0001 % (QV-Value > 60). Dieser Qualitätswert entspricht weniger als einem Basenfehler unter einer Million Basenpaaren. Es konnten keine zusätzlichen Plasmide detektiert werden. Das vollständige Genom hat eine Größe von 3.352.175 bp und weist einen durchschnittlichen GC-Gehalt von 58,7 % auf (siehe Abb. 11). Mit Hilfe einer PGAP-Annotation konnten 3.087 proteinogene Sequenzen, 58 tRNAs und 5 vollständige rRNA-Operons (5S, 16S und 23S) im Genom von *Kyrpidia sp.* detektiert werden.

Während der Masterarbeit, in welcher *Kyrpidia sp.* in Reinkultur gebracht wurde, konnte ein 16S-rDNA-Amplifikat generiert und einer BLAST-Suche unterzogen werden. Anhand dieses Amplifikats wurde eine 16S-Identity von 98 % gegenüber dem nächsten Verwandten, *Kyrpidia tusciae* aus der Familie der *Alicyclobacillaceae*, bestimmt. Es konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden, ob es sich bei dem Isolat um einen Stamm der Art *K. tusciae* oder eine neue Art der Gattung *Kyrpidia* handelt. Ein Nachteil einer PCR-basierten 16S-rDNA-

Amplifikation (wie in der genannten Arbeit durchgeführt) ist die mangelnde Selektivität der Amplifikation beim Auftreten mehrerer Kopien des 16S rRNA-Gens. Zur genaueren genotypischen Analyse wurden alle fünf Kopien des 16S rRNA-Gens aus dem assemblierten Genom extrahiert und jeweils einzeln einer BLAST-Analyse unterzogen. Dabei konnte eine maximale 16S-Sequenzähnlichkeit zwischen 97,79 % und 97,85 % zu *K. tusciae* bestimmt werden. Diese liegt unter dem derzeitigen maximalen Grenzwert von 98,65 %, welcher zur Artabgrenzung anhand von 16S-Sequenzvergleichen herangezogen wird (Kim *et al.*, 2014). Abb. 12 zeigt eine phylogenetische Einordnung des Isolates in den Stammbaum der *Alicyclobacillaceae*, basierend auf den fünf isolierten 16S rRNA Genkopien.

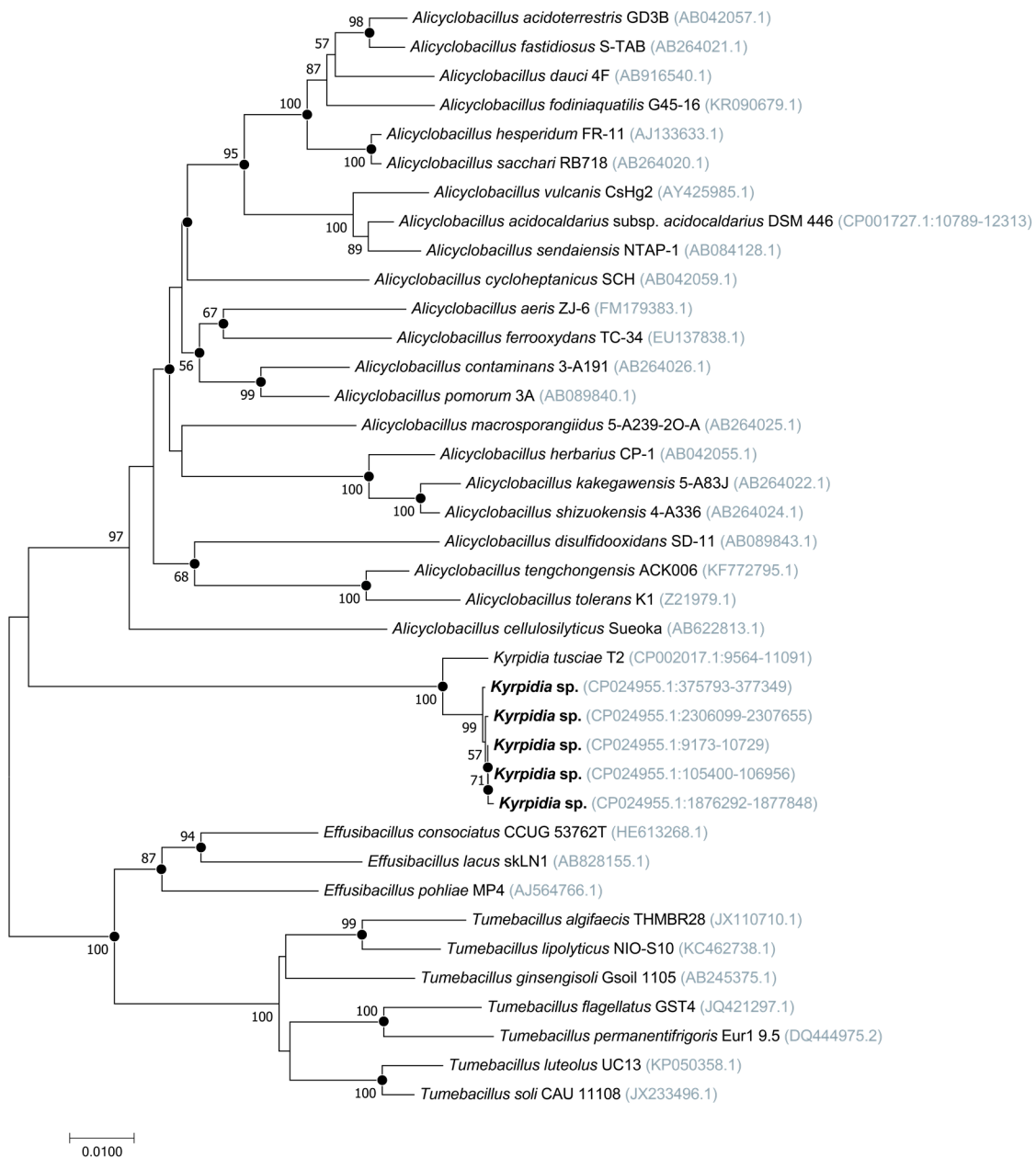


Abb. 12: Phylogenetische Einordnung des Isolates in den Stammbaum der *Alicyclobacillaceae*, basierend auf den fünf isolierten 16S rRNA Genkopien. Der Stammbaum wurde anhand der *Neighbour-Joining*-Methode berechnet. *Bootstrap*-Werte (basierend auf 1000 Replikaten) über 50 % sind an den Knotenpunkten vermerkt. Schwarze Kreise kennzeichnen Knotenpunkte, welche durch eine Stammbaumkalkulation mit der *Maximum-Parsimony*-Methode bestätigt wurden. NCBI-Accession-Nummern der verwendeten Gensequenzen sind in Klammern angegeben.

Obwohl genotypische Analysen spezifischer Genloki (e.g. 16S rRNA Gene) nach wie vor ein häufig gebrauchtes Kriterium zur Bestimmung der taxonomischen Artzugehörigkeit von Mikroorganismen darstellen, entwickeln sich gesamtgenombasierte Ansätze zur Artabgrenzung immer mehr zum „Goldstandard“ (Meier-Kolthoff & Göker, 2019). Daher wurden auch in dieser Arbeit zwei verschiedene genombasierte Untersuchungen durchgeführt. Zum einen wurde die sogenannte ANI (*Average Nucleotide Identity*) bestimmt. Des Weiteren wurde eine GBDP-Analyse (*Genome BLAST Distance Phylogeny method*) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine *in silico* Schätzung der Ergebnisse einer nasschemischen DNA-DNA-Hybridisierung (DDH). In Tab. 37 sind die Ergebnisse dieser genombasierten Analysen sowie die maximalen Grenzwerte zur Artabgrenzung aufgelistet. Darüber hinaus ist in Abb. 13 ein GPDP-basierter phylogenetischer Stammbaum des Isolates und der am nächsten verwandten Typstämme (mit bekannter Genomsequenz) gezeigt.

Tab. 37: Ergebnisse der genombasierten, phylogenetischen Untersuchungen.

<i>Kyrpidia</i> sp. vs.	<i>In silico</i> DDH	ANI
<i>Kyrpidia tusciae</i> DSM 2912	55,9 %	94,42 %
<i>Alicyclobacillus contaminans</i> DSM 17975	34,1 %	67,76 %
<i>Effusibacillus lacus</i> DSM 27172	33,9 %	67,06 %
<i>Bacillus nanhaiisediminis</i> CGMCC 1.10116	33,8 %	62,89 %
<i>Alicyclobacillus kakegawensis</i> NBRC 103104	29,8 %	68,38 %
<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i> NBRC 100859	28,5 %	66,92 %
<i>Alicyclobacillus macrosporangiidus</i> DSM 17980	28,4 %	68,78 %
<i>Alicyclobacillus montanus</i> USBA-GBX-503	27,0 %	65,70 %
<i>Effusibacillus pohliae</i> DSM 22757	25,3 %	68,26 %
Maximaler Grenzwert zur Artabgrenzung:	70 %	95-96 %

Das Ergebnis der *in silico* DDH zum nächsten Verwandten des Isolates, *Kyrpidia tusciae*, betrug 55,9 %. Dieser Wert liegt deutlich unter dem typischerweise zur Artabgrenzung herangezogenen maximalen Grenzwert von 70 % DNA-DNA-Homologie. Die Kalkulation der ANI lässt ebenfalls auf eine unterschiedliche Artzugehörigkeit der beiden verwandten Spezies schließen. Abschließend wurden die annotierten Genome der beiden Organismen mit Hilfe des OrthoVenn-Tools in orthologe Cluster eingeteilt und auf Homologien untersucht (siehe Abb. 14). Dabei wurden je 210 artspezifische Gencluster identifiziert. Das Pangenom der beiden Organismen besteht hingegen aus 2616 Genclustern. Zusammenfassend kann aufgrund der durchgeführten phylogenetischen Analysen mit sehr großer Sicherheit davon ausgegangen werden, dass es sich bei *Kyrpidia* sp. um eine neue Art der Gattung *Kyrpidia* handelt.

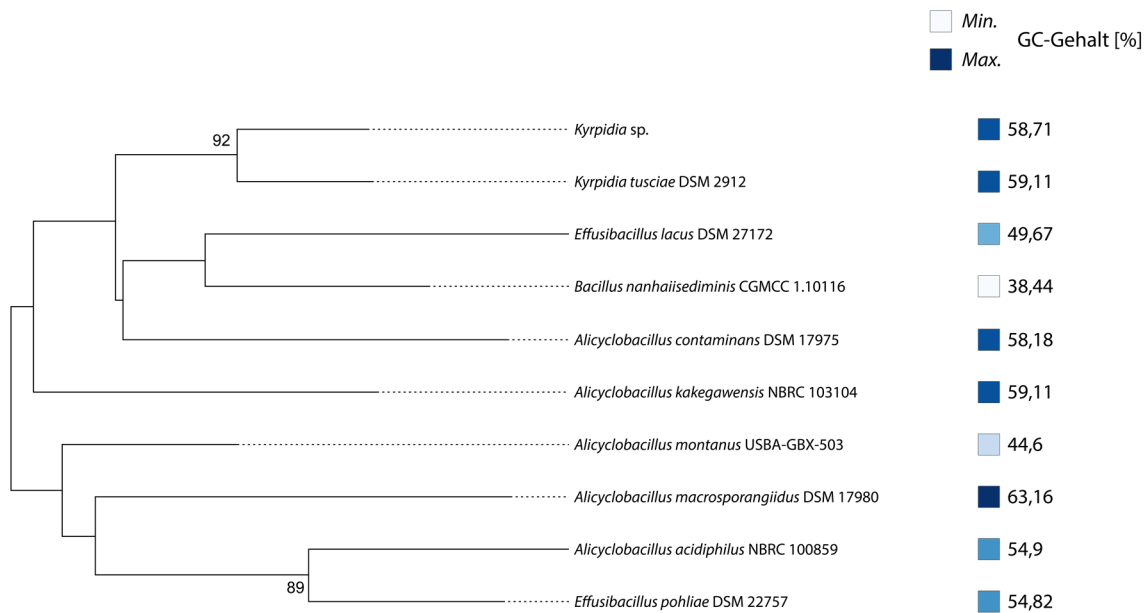


Abb. 13: Gesamtgenombasierter, phylogenetischer Stammbaum basierend auf den Ergebnissen der GDPD-Analyse. Aufgeführt sind die zum *Kyrpidia*-Isolat am nächsten verwandten Typstämme und deren genomischer GC-Gehalt in Prozent.

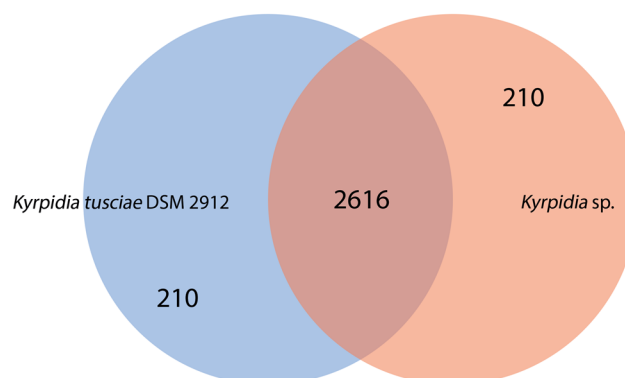


Abb. 14: Venn Diagramm der orthologen und homologen Gencluster von *Kyrpidia tusciae* und *Kyrpidia* sp.

3.4 Artbeschreibung *Kyrpidia spormannii* EA-1^T

Aufgrund der distinkten phylogenetischen Einordnung des thermophilen Isolates wurde die neue Spezies nach den internationalen Nomenklaturregeln des ICNBs (*International Code of Nomenclature of Bacteria*) in einer namensgebenden Publikation in der Fachzeitschrift *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* beschrieben (Reiner *et al.*, 2018). Im Rahmen dieser Publikation wurde der neu entdeckten Art der Name „*Kyrpidia spormannii*“ [krɔv'mannɪ.i] verliehen und der Artnamen somit in die „*Approved List of Bacterial Names*“ des ICNBs aufgenommen. Das thermophile Isolat dient als Typstamm „EA-1^T“ der Art *K. spormannii* und wurde in zwei internationalen Stammsammlungen archiviert (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen: DSMZ 106492^T; Culture

Collection of Switzerland: CCOS 1194^T). Der Arname wurde zu Ehren des deutsch-amerikanischen Mikrobiologen Alfred M. Spormann, seinem 60. Geburtstag und zur Würdigung seiner Forschung auf dem Gebiet der Mikrobiologie, insbesondere der mikrobiellen Elektrosynthese, vergeben. Neben den bereits beschriebenen genom-basierten phylogenetischen Untersuchungen sind weitere chemotaxonomische, morphologische und physiologische Analysen für eine gültige Artbeschreibung notwendig. Im Folgenden soll auf diese durchgeführten Stammcharakterisierungen zur Artabgrenzung eingegangen werden.

3.4.1 Morphologische Beschreibung

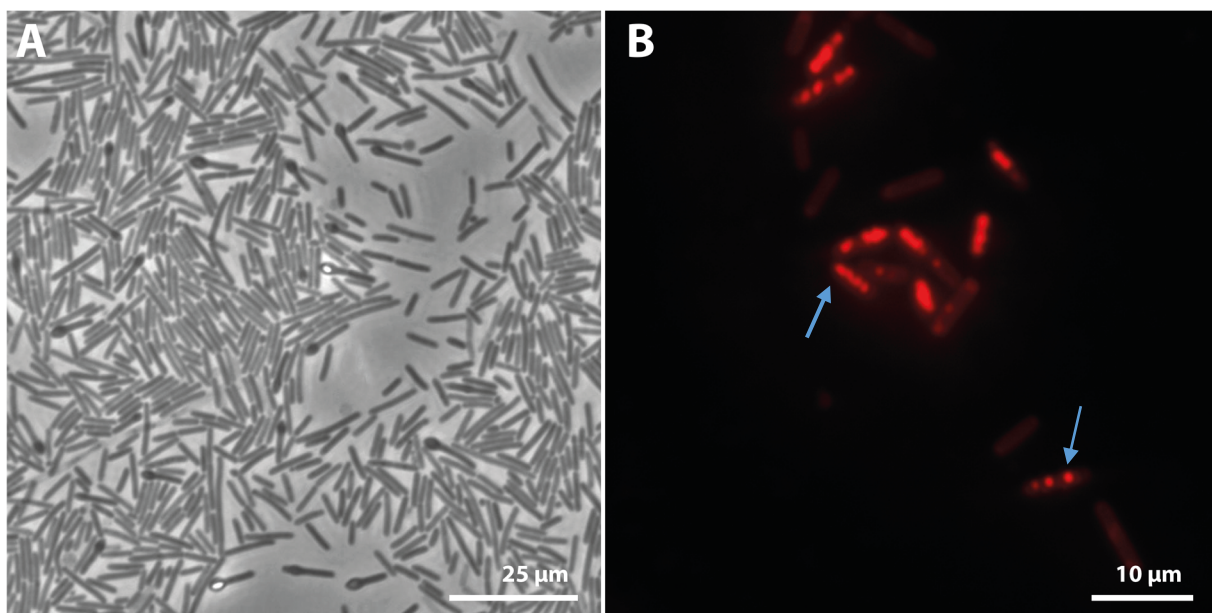


Abb. 15: Mikroskopische Aufnahmen von *K. spormannii* EA-1^T. A. Phasenkontrastaufnahme einer heterotrophen *K. spormannii*-Kultur. An vereinzelt Zellen sind endständige Sporen erkennbar. B. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer mit Nilrot gefärbten heterotrophen *K. spormannii*-Kultur. Mit blauen Pfeilen wurden exemplarisch die angefärbten PHB-Granula markiert.

Bei *K. spormannii* handelt es sich um ein stäbchenförmiges, oxidase- und Gram-positives Bakterium mit einer Größe von $0,7 - 1,2 \times 4 - 8 \mu\text{m}$. In Phasenkontrastaufnahmen sind endständige, ovale Endosporen zu erkennen (Abb. 15A). Nach 48-120 h Inkubationszeit bildet *K. spormannii* kleine, elfenbeinweiße Kolonien auf R2A_m-Platten aus. Zelluläre PHB-Einschlüsse konnten mittels Nilrotfärbung nachgewiesen werden (Abb. 15B).

3.4.2 Chemotaxonomische Untersuchungen

Die Untersuchungen der chemotaxonomischen Merkmale von *K. spormannii* wurden durch den Identifikationsservice der DSMZ in Braunschweig durchgeführt. Dabei wurden Analysen zur Bestimmung der zellulären Fettsäuren und polaren Lipide, der respiratorischen Chinone,

der „Ganzzellzucker“ und der Diaminopimelinsäure-Isomere in Auftrag gegeben. Aufgrund des hohen Einflusses der Kultivierungsbedingungen auf die Zusammensetzung der zellulären Fettsäuren und der polaren Lipide, wurden diese chemotaxonomischen Merkmale, neben der Bestimmung der respiratorischen Chinone, auch für den nächsten Verwandten und zuvor alleinigen Vertreter der Gattung *Kyrpidia*, *Kyrpidia tusciae*, durchgeführt. Beide Organismen wurden hierfür im gleichen Medium kultiviert und die Zellmasse anschließend der DSMZ zur Verfügung gestellt. Die in beiden Stämmen am häufigsten auftretenden zellulären Fettsäuren waren iso-C_{16:0}, anteiso-C_{17:0} und iso-C_{17:0} mit einer Häufigkeit von 13,3 %, 23,0 % und 49,9 % in *K. spormannii*, sowie 36,5 %, 18,7 % und 26,8 % in *K. tusciae*. Das gesamte Fettsäureprofil beider Spezies kann im Appendix auf Seite 136 eingesehen werden. Es konnten in beiden Organismen keine (der Familie der *Alicyclobacillaceae* namensgebenden) ω -alicyklischen Fettsäuren nachgewiesen werden. In beiden Stämmen konnte alleinig Menachinon 7 (Mk-7) als respiratorisches Chinon nachgewiesen werden. Phosphatidylglycerol, Diphosphatidylglycerol und Phosphatidylethanolamin konnten in beiden Stämmen als Teil der polaren Lipide identifiziert werden. Im Rahmen der Lipidanalyse konnten zudem jedem Stamm je zwei unidentifizierbare Phospholipide, Glykolipide und Lipide nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnten *K. tusciae* zwei weitere unidentifizierte Glykolipide und ein unidentifiziertes Lipid zugeordnet werden (Aufnahmen der Dünnschichtchromatographien der Lipidanalysen sind im Appendix auf Seite 136 zu finden). Abschließend konnte mit Hilfe der übrigen chemotaxonomischen Analysen das Isomer meso-Diaminopimelinsäure im Peptidoglycan und die Zucker Mannose, Arabinose und Ribose in der Zellwand von *K. spormannii* nachgewiesen werden.

3.4.3 Physiologische Untersuchungen

Zur eingehenden physiologischen Stammcharakterisierung sollten verschiedene Wachstumsparameter der neuen Art bestimmt werden. Da kein Wachstum in LB-Medium detektiert werden konnte, wurden die Wachstumsparameter Temperatur, pH-Wert in R2A_m-Medium bestimmt. Alle weiteren Analysen wurden in ES-Medium durchgeführt. Das Temperaturoptimum von *K. spormannii* konnte auf 55 °C in einem Wachstumsbereich von 45 - 65 °C festgelegt werden. Es konnte kein Wachstum mehr bei Temperaturen von unter 37 °C und über 70 °C nachgewiesen werden. Während sämtlicher Wachstumsversuche wurde auf ein Schütteln der Kulturgefäße verzichtet, da dies einen hemmenden Einfluss auf das Kulturwachstum zur Folge hatte. In R2A_m-Medium, das mit Hilfe von McIlvaine-Puffer auf verschiedene pH-Werte eingestellt wurde, zeigte das Isolat Wachstum in einem pH-Bereich

von 4 - 7,5 mit einem pH-Optimum von 5,5. Alle folgenden Analysen wurden aufgrund der definierten Zusammensetzung in Minimalmedium durchgeführt (ES-Medium versetzt mit 1g Natriumpyruvat l⁻¹): Die inhibitorische Salzkonzentration wurde anhand von Natriumchlorid bestimmt und betrug 1,5 % (w/v). Zur Evaluation des Wachstums auf unterschiedlichen Stickstoffquellen wurde Ammoniumchlorid im ES-Medium in verschiedenen Ansätzen jeweils durch Asparagin, Natriumnitrat, Natriumnitrit und Harnstoff ersetzt. Ausschließlich Ammoniumchlorid und Asparagin konnten als alleinige Stickstoffquelle genutzt werden. Es konnte keine Stickstofffixierung durch *K. spormannii* nachgewiesen werden. Anaerobes Wachstum konnte anhand der untersuchten Elektronenakzeptoren Nitrat, Sulfat, DMSO und Fumarat nicht demonstriert werden. Darüber hinaus wurde Glukose nicht fermentiert. Das Verwertungsprofil unterschiedlicher Kohlenstoffquellen wurde sowohl für *K. spormannii* als auch für *K. tusciae* in ES-Medium (ohne Zugabe von Pyruvat) mit Hilfe von sogenannten *Biolog PM1 phenotype array plates* bestimmt. Die Kohlenstoffquellen α -Ketoglutar säure, D-Alanin, D-Äpfelsäure, Bernsteinsäure und Monomethylsuccinat konnten von beiden Spezies verstoffwechselt werden. *K. spormannii* konnte darüber hinaus Verbindungen wie Acetat, Acetoacetat, Pyruvat und einige Hexosen und Pentosen verwerten (Für eine vollständige Übersicht siehe Tab. 38). Alle hier nicht explizit aufgeführten Kohlenstoffquellen (siehe Kap. 2.10.3) wurden von keiner der beiden Spezies verstoffwechselt.

Tab. 38: Zusammenfassung der physiologischen und morphologischen Unterschiede, welche zur Differenzierung der beiden Spezies der Gattung *Kyrpidia* herangezogen werden können. Gleiche Eigenschaften wurden nicht in die Tabelle aufgenommen und müssen dem Fließtext entnommen werden. +, Wachstum oder positives Testresultat; - kein detektiertes Wachstum oder negatives Testresultat. *, Daten wurden der Literatur entnommen (Bonjour & Aragno, 1984; Klenk *et al.*, 2011).

Eigenschaft	<i>K. spormannii</i> EA-1 ^T	<i>Kyrpidia tusciae</i> DSM2912 ^T
Zellform	0,7 - 1,2 × 4 - 8 μ m	0,8 × 4 - 5 μ m*
Oxidase-Aktivität	+	schwach*
pH-Optimum	5.5	4.2-4.8*
Inhibitorische Salzkonzentration (NaCl w/v)	1.5 %	1 %*
Alleinige Stickstoffquelle:		
Harnstoff	-	+*
Alleinige Kohlenstoffquelle:		
Acetat	+	-
Acetoacetat	+	-
D-Fructose	+	-
D-Galactose	+	-
D-Galactouronsäure	+	-

D-Glucose	+	-
D-Mannose	+	-
D- Psicose	+	-
D-Ribose	+	-
D-Xylose	+	-
Glucuronamid	+	-
L-Arabinose	+	-
L-Fucose	+	-
L-Lyxose	+	-
L-Rhamnose	+	-
Pyruvat	+	-

3.4.4 Genome-Mining

Im abschließenden Teil der Stammbeschreibung von *K. spormannii* wurden die Genome der beiden bekannten *Kyrpidia*-Spezies auf Unterschiede und Homologien in den zentralen Stoffwechselgenen untersucht. Dabei wurde ein besonderer Fokus auf die Glykolyse, den Pentosephosphatweg, den Citratzyklus, sowie den Schwefel- und den Stickstoffmetabolismus gesetzt. Des Weiteren sollten die Schlüsselenzyme des autotrophen Wachstums und Unterschiede in der Atmungskette der beiden Organismen detektiert werden. Darüber hinaus sollten Transporter für die Aufnahme organischer Verbindungen in den Genomen der beiden Spezies identifiziert werden. Eine tabellarische Übersicht der untersuchten Gene mit Angabe der Identität zwischen den jeweiligen homologen Proteinsequenzen beider Spezies kann im Appendix auf Seite 137 eingesehen werden. Der Vergleich der homologen Gene des zentralen Kohlenstoffstoffwechsels zeigte lediglich geringe Unterschiede in Präsenz und Sequenz der respektiven Gene. Beiden Spezies konnte alle Gene der Glykolyse, des Pentosephosphatweges und des Citratzyklus nachgewiesen werden. Die Proteinidentitäten dieser Gene reichte von 89,2 - 99,7 %. Trotz der geringen Unterschiede im zentralen Kohlenstoffmetabolismus konnten ausschließlich im Genom von *K. spormannii* ein putativer C4-Dicarboxylat-Transporter und vier putative Zuckertransporter gefunden werden. Während keine eklatanten Unterschiede in den untersuchten Genen mit einer mutmaßlichen Beteiligung am Schwefelmetabolismus der beiden *Kyrpidia*-Arten gefunden werden konnten (95,8 % - 99,8 % Proteinidentität), konnten signifikante Unterschiede zwischen den möglicherweise am Stickstoffmetabolismus beteiligten Genen festgestellt werden. So konnte ausschließlich im Genom von *K. tusciae* die genetische Information für respiratorische Nitrit- und Nitratreduktasen gefunden werden. Das Genom von *K. spormannii* enthält hingegen Gene, die möglicherweise für eine Nitrogenase zur

Fixierung von elementarem Stickstoff codieren. Der Nachweis von Genen, welche für die Schlüsselenzyme RuBisCO (*Typ I*) und Ribulose-5-phosphat-Kinase codieren, sowie das Fehlen der genomischen Information anderer CO₂-Fixierungswege, legt eine Kohlenstofffixierung mit Hilfe des Calvin-Zyklus in den zwei *Kyrpidia*-Spezies nahe. Mit einer Proteinidentität von 99,4 % - 100 % liegen diese Gene in beiden Organismen in konservierter Form vor. Anschließend wurden die Genome der beiden Knallgasbakterien nach einer für das chemoautotrophe Wachstum notwendigen Hydrogenase durchsucht. In den Genomen beider Organismen konnten je die Gene einer [NiFe]-Hydrogenase (bestehend aus zwei Untereinheiten) gefunden werden. Überraschenderweise weisen die in *K. spormannii* gefundenen Hydrogenase-Gene nicht nur eine geringe Proteinhomologie zu den beiden Untereinheiten der [NiFe]-Hydrogenase aus *K. tusciae* (41,1 % und 57,1%), sondern auch gegenüber allen bisher bekannten bakteriellen Hydrogenasen auf (42,8 % und 56,97 %). Interessanterweise teilt die elektronenübertragende kleine Hydrogenase-Untereinheit die höchste Proteinidentität (56,97 %) mit *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Die phylogenetischen Stammbäume auf Seite 142 des Appendix (basierend auf den einzelnen Hydrogenase-Untereinheiten aus *K. spormannii*) verdeutlichen die evolutionäre Unität der gefundenen Hydrogenase. Ferner wurde im Rahmen dieser Genomanalyse die genetische Information für eine zusätzliche Menaquinoloxidase (Cytochrom *aa3-600*-Typ) im Genom von *K. spormannii* gefunden. Eine ausführliche Besprechung eines Modells der Atmungskette von *K. spormannii* ist Abschnitt 3.6 dieser Arbeit zu entnehmen.

3.5 Mikroskopische Aktivitätsanalyse des kathodischen Biofilms

Der folgende Teil der Arbeit soll sich nun vollständig den weiteren Untersuchungen zur Elektroautotrophie von *K. spormannii* widmen. Die zuvor durchgeführte Stammcharakterisierung diente den weiteren Untersuchungen der Elektroaktivität und des potenziellen Kathodenwachstums des Isolates als Grundlage. Erste Hinweise auf die Fähigkeit zum elektroautotrophen Wachstum von *K. spormannii* auf Kathoden konnten bereits im initialen Screening (siehe Seite 69) erlangt werden. So konnte ein - durch einen *K. spormannii*-Biofilm katalysierter - Stromverbrauch in einem mikrobiellen Elektrosynthesereaktor beobachtet werden. Diesen Hinweisen sollte nun weiter nachgegangen werden. Zunächst sollte anhand von mikroskopischen Analysen die Aktivität der *K. spormannii*-Zellen im kathodischen Biofilm nachgewiesen werden. Zum einen wurde ein Vitalitätsassay basierend auf der Membranintegrität der Zellen, eine sogenannte Live/Dead-Färbung, durchgeführt (siehe Abb. 16A). Mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie

können so Zellen mit einer intakten Membran - diese weisen eine grüne Fluoreszenz auf - von toten Zellen, welche durch eine rote Fluoreszenz gekennzeichnet sind, unterschieden werden. Der kathodische *K. spormannii*-Biofilm auf Graphitfasern des Kathodenvlieses aus einem Elektrosynthesereaktor wird deutlich von vitalen Zellen dominiert. Es konnten lediglich vereinzelte Zellen mit Propidiumiodid angefärbt werden (durch die Überlagerung der Fluoreszenzsignale weisen diese Zellen in Abb. 16A eine gelb-oranges Fluoreszenzsignal auf).

Um eine physiologische Aktivität der kathodischen, vitalen Zellen nachzuweisen wurde als weitere mikroskopische Analyse eine sogenannte Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) durchgeführt. Hierbei wurden die 16S-Untereinheiten der ribosomalen RNA mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden markiert. Da es sich bei zellulärer, ribosomaler RNA um ein äußerst instabiles Molekül mit einer kurzen Halbwertszeit von nur wenigen Minuten handelt und diese nur von physiologisch aktiven Zellen exprimiert wird, kann solch ein Ribosomennachweis zur Aktivitätsanalyse herangezogen werden. Abb. 16B zeigt einen kathodischen *K. spormannii*-Biofilm nach durchgeführter FISH-Analyse. Die erfolgreiche Färbung mit der bakterienspezifischen EUB388-Sonde belegt eindeutig die Aktivität des kathodischen Biofilms.

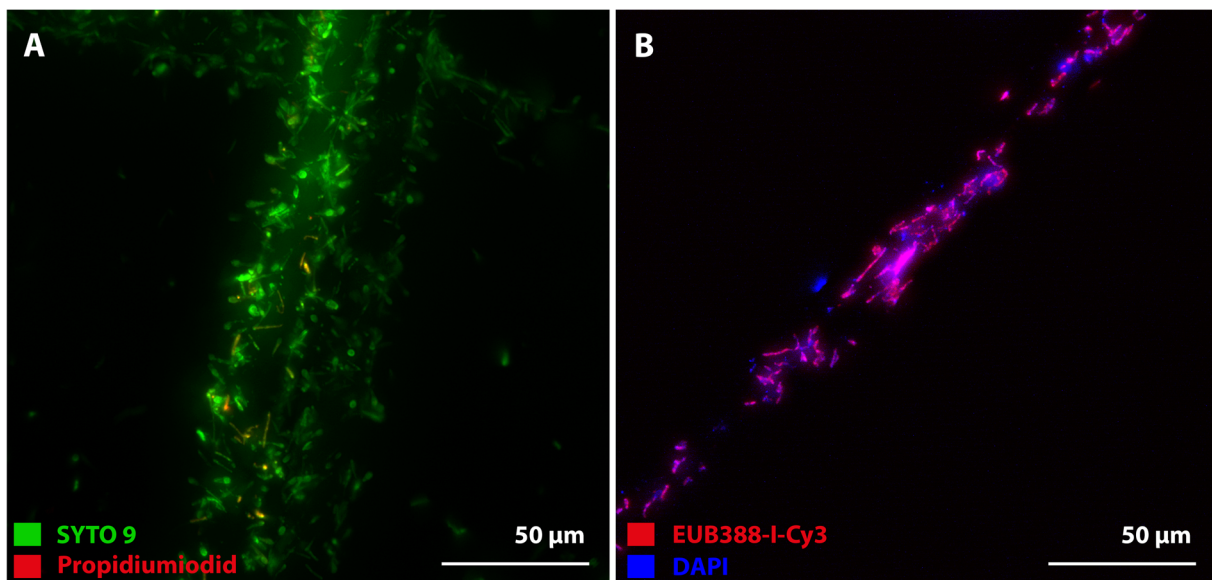


Abb. 16: Mikroskopische Aktivitätsanalysen des kathodischen Biofilms nach 10 Tagen in einem bioelektrochemischen System. A. Live/Dead-Färbung basierend auf der Membranintegrität (SYTO9 ist membrangängig, Propidiumiodid hingegen nicht). B. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit einer bakterienspezifischen Sonde (rot).

3.6 Komparative Transkriptomanalyse

Nachdem die Aktivität des Biofilms bestätigt werden konnte, sollte zum tieferen Verständnis der zellulären, physiologischen Prozesse eines kathodischen *K. spormannii*-Biofilms eine vergleichende Genexpressionsanalyse unter verschiedenen Wachstumsbedingungen

durchgeführt werden. So wurde die Genexpression heterotropher, lithoautotropher (Wasserstoff als Elektronendonator) und elektroautotropher *K. spormannii*-Kulturen verglichen. Dabei sollte zum einen die Expression von Genen des zentralen Kohlenstoffwechsels, insbesondere von Genen zur CO₂-Fixierung, untersucht werden. Zum anderen sollte der Transkriptomdatensatz auf mögliche EET-Mechanismen zur Elektronenaufnahme von der Kathode untersucht werden. Alle Kulturen wurden zunächst in ES-Medium kultiviert. Um heterotrophe Bedingungen zu erlangen, wurde dem Medium Brenztraubensäure als Kohlenstoffquelle hinzugefügt. Lithoautotrophe Bedingungen wurden durch eine Gasphase aus H₂, CO₂ und O₂ (80:15:5, v/v/v/) gewährleistet. Dabei stellte CO₂ die einzige Kohlenstoffquelle im System dar. Elektroautotroph kultivierte Zellen wurden aus einem kathodischen Biofilm (-500 mV vs. SHE) eines mikrobiellen Elektrosynthesereaktors mit einer CO₂/O₂-Begasung (95:5, v/v) geerntet. Anschließend wurde aus der Biomasse aller Kulturen RNA isoliert und diese einer Illumina-Sequenzierung unterzogen. Als Referenzgenom der Transkriptomanalyse diente das in Kapitel 3.3 sequenzierte Genom. Über 90 % der Sequenzinformationen der Rohdaten konnten der Referenzsequenz zugeordnet werden (Tab. 39).

Tab. 39: Mapping-Statistik der Transkriptomanalyse.

Sample	Gemappte Reads in %
Heterotroph 1	92,35
Heterotroph 2	94,89
Lithoautotroph 1	99,54
Lithoautotroph 2	96,33
Elektroautotroph 1	93,13
Elektroautotroph 2	92,35

Unter jeder der drei Kultivierungsbedingungen konnte eine Expression von über 3000 codierenden Bereichen aus dem Referenzgenom detektiert werden. Eine vergleichende Expressionsstatistik wurde für elektroautotrophe gegen lithoautotrophe und heterotrophe sowie für lithoautotrophe gegen heterotrophe Bedingungen durchgeführt. Die Anzahl der signifikant hochregulierten Gene variierte je nach Bedingungen zwischen 258 (lithoautotroph gegen heterotroph) und 533 (elektroautotroph gegen heterotroph) (siehe Tab. 40 und Abb. 17).

Tab. 40: Anzahl exprimierter Gene unter den getesteten Bedingungen.

Statistiken zur Transkriptomanalyse			
Bedingung	Heterotroph	Lithoautotroph	Elektroautotroph
Anzahl exprimierter Gene ($tpm > 0$)	3226	3259	3275
Vergleichende Bedingungen	Elektroautotroph vs. Lithoautotroph	Elektroautotroph vs. Heterotroph	Lithoautotroph vs. Heterotroph
Anzahl signifikant hochregulierter Gene ($FDR\ p\text{-value} > 0,01$; $\log_2FC > 2$)	349	533	258

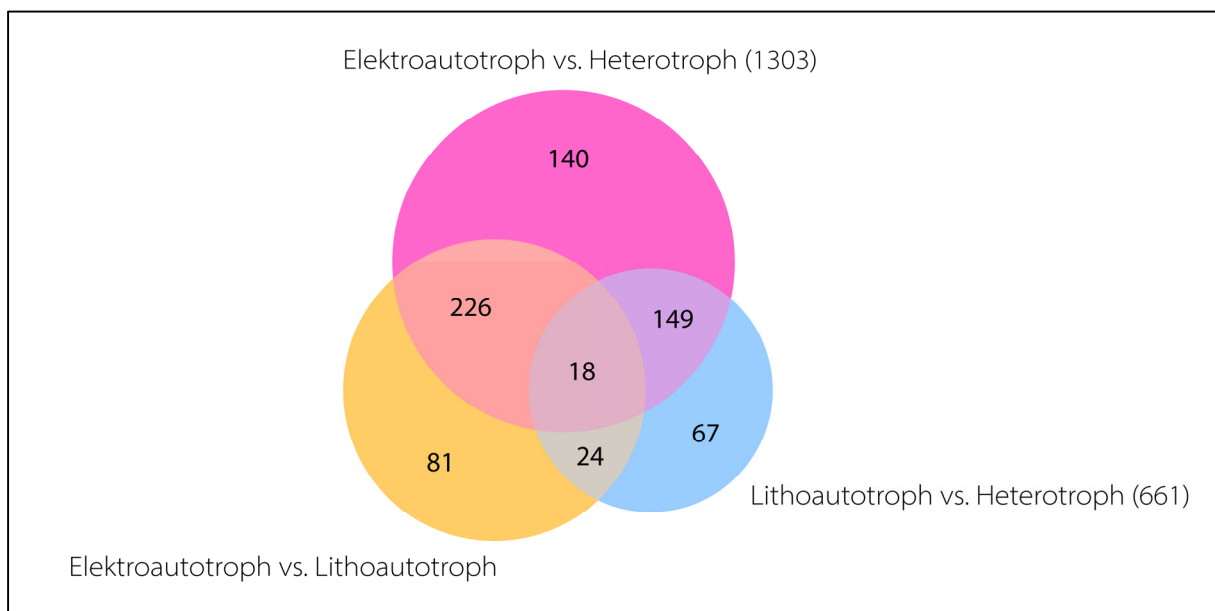


Abb. 17: Venn-Diagramm der signifikant hochregulierten Gene.

Die im Rahmen der multivariaten Statistik durchgeführte Hauptkomponentenanalyse der Transkriptomdaten legt distinkte Expressionsprofile der drei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen dar (siehe Abb. 18). So unterscheidet sich die Genregulation unter elektroautotrophen Bedingungen nicht nur deutlich von heterotrophen, sondern auch von lithoautotrophen Bedingungen. Während die Varianz der Genexpression innerhalb der lithoautotrophen und heterotrophen Samples recht gering ist, weisen die beiden elektroautotrophen Biofilmproben eine geringfügig größere Streuung im PCA-Plot auf.

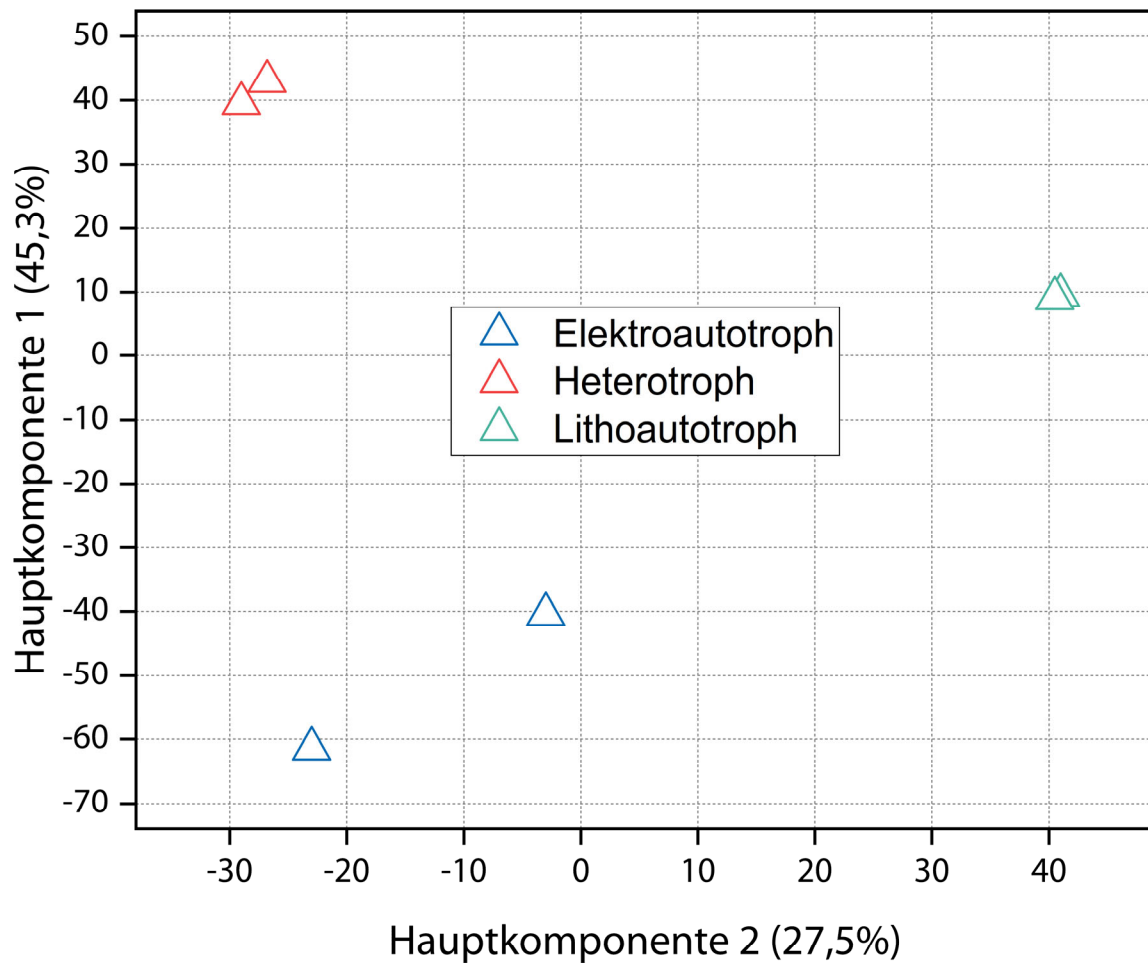


Abb. 18: Hauptkomponentenanalyse des Transkriptomdatensatzes.

Als Nächstes sollte die spezifische Expression von Genen zur CO₂-Fixierung während des kathodischen Wachstums untersucht werden, um somit in Erfahrung zu bringen, ob sich auf Transkriptebene die vermutete Kopplung des Stromverbrauchs eines mikrobiellen Elektrosynthesereaktors mit einer Fixierung von CO₂ durch *K. spormannii* bestätigen lässt. Die im Rahmen der Stammcharakterisierung von *K. spormannii* durchgeführte Genomanalyse erbrachte erste Hinweise auf eine CO₂-Fixierung über den Calvin-Zyklus. Diese Annahme konnte anhand der Transkriptomdaten bestätigt werden, da eine starke Expression von Genen, welche für einen vollständigen Calvin-Zyklus codieren, sowohl unter lithoautotrophen als auch unter elektroautotrophen Wachstumsbedingungen nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 19). So gehörten die Gene der Schlüsselenzyme des Calvin-Zyklus (RuBisCO und Phosphoribulokinase) mit zu den 40 am höchsten exprimierten Genen unter elektroautotrophen Bedingungen.

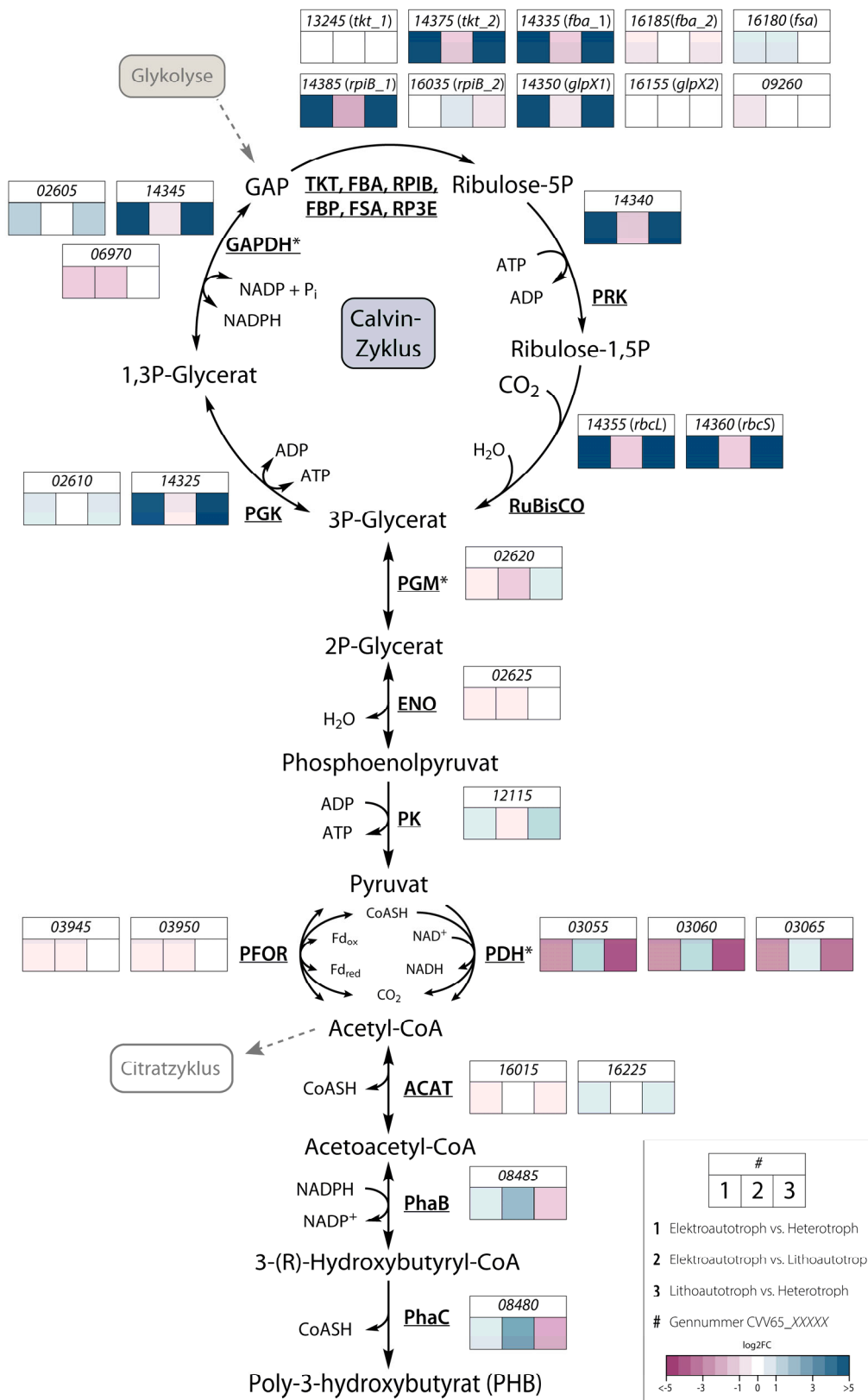


Abb. 19: Modell des Kohlenstoffflusses von CO₂ zu PHB in *K. spormannii*. Die Gennummern sowie die relative Expressionsänderung (Log₂FC) sind reaktionszugehörig dargestellt. Zusätzliche Genkopien beteiligter Enzyme mit vernachlässigbarer Expression sind nicht aufgeführt (Betroffene Enzyme sind mit einem Sternchen markiert). TKT – Transketolase; FBP – Fructose-1,6-Bisphosphatase; FSA – Fructose-6-Phosphat-Aldolase; FBA – Fructose-1,6-Bisphosphat-Aldolase; RPIB – Ribose-5-Phosphat-Isomerase; PRK – Phosphoribulokinase; RuBisCO – Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase; GAPDH – Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; PGM – Phosphoglycerat-Mutase; ENO – Enolase; PK – Pyruvatkinase; PDH – Pyruvatdehydrogenase; PFOR – Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase; ACAT – Acetyl-CoA-Acyltransferase; PhaB – Acetoacetyl-CoA-Reduktase; PhaC – PHB-Polymerase.

Die Expression des Calvin-Zyklus-Genclusters, welches unter Kontrolle des Regulators CbbR steht, war hingegen unter heterotrophen Bedingungen vernachlässigbar gering (Dangel & Tabita, 2015; Van Keulen *et al.*, 1998). Allgemein gilt an dieser Stelle zu vermerken, dass das Expressionsprofil der elektroautotroph gewachsenen Zellen durch einen rege exprimierten zentralen Kohlenstoffmetabolismus um einen vollständig geschlossenen Citratzyklus gekennzeichnet war. Da es sich bei *K. spormannii* um einen natürlichen PHB-Produzenten handelt, sollte weiterhin die PHB-Syntheseroute ausgehend von CO₂ untersucht werden. Polyhydroxybutyrat wird nicht nur die Rolle eines mikrobiellen Speicherstoffs zu Teil, sondern dieses Biopolymer eignet sich ebenfalls als Ausgangsverbindung zur Synthese biologisch abbaubarer Biokunststoffe. Somit handelt es sich bei PHB um ein interessantes, potenzielles Produkt eines zukünftigen mikrobiellen Elektrosyntheseprozesses. Abb. 19 fasst den potenziellen Stoffwechselweg von CO₂ zu PHB zusammen. Darüber hinaus wird in dieser Abbildung die Expressionsstatistik der beteiligten Gene in Form einer Heatmap dargestellt (Eine Abbildung, in welcher jedoch absolute Expressionswerte (tpm) angegeben werden, kann dem Appendix auf Seite 145 entnommen werden). Das Endprodukt der CO₂-Assimilation durch den Calvin-Zyklus, 3-Phosphoglycerat, wird über die letzten Schritte der Glykolyse in Pyruvat umgewandelt. Anschließend kann die α -Ketosäure entweder über eine Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase oder durch eine NAD-abhängige Pyruvatdehydrogenase zu Acetyl-CoA decarboxyliert werden. Zur Synthese von PHB aus Acetyl-CoA werden drei weitere Enzyme benötigt, deren Expression unter allen Bedingungen validiert werden konnte. Interessanterweise konnte unter elektroautotrophen Bedingungen eine signifikant höhere Expression der Gene *phaB* und *phaC* gegenüber lithoautotrophen Bedingungen festgestellt werden. Der ebenfalls detektierten, höheren Expression unter elektroautotrophen Bedingungen gegenüber heterotrophen Bedingungen konnte allerdings keine Signifikanz nachgewiesen werden. Die entsprechenden Enzyme PhaB und PhaC katalysieren die beiden finalen Reaktionen der PHB-Synthese.

Sowohl die CO₂-Fixierung als auch die PHB-Synthese sind den anabolen Zellreaktionen zuzuschreiben und demnach an einen Verbrauch von Reduktionsäquivalenten (insbesondere NADPH) zur Kohlenstoffreduktion gekoppelt. Daher sollte anhand der Transkriptomdaten ein Modell der Atmungskette von *K. spormannii* erstellt werden, um mögliche NADPH- und ATP-Syntheserouten während des autotrophen Wachstums aufzuklären (Abb. 20). Wasserstoff als respiratorischer Elektronendonator ermöglicht auf Grund seines geringen Redoxpotentials (-420 mV vs. SHE unter Standardbedingungen) eine direkte Reduktion von NADP zu NADPH. In Mikroorganismen wird diese Reaktion durch eine

spezifische Hydrogenase katalysiert. Obwohl *K. spormannii* zu hydrogenotrophem Wachstum befähigt ist, konnte solch eine NADP-reduzierende, (typischerweise) zytoplasmatische Hydrogenase nicht identifiziert werden. Eine weitere Möglichkeit zur Regeneration von Reduktionsäquivalenten stellt der sogenannte reverse Elektronentransport dar. Hierbei dienen Elektronen aus dem Chinonpool als Elektronendonator der Reduktion von NAD durch eine membrangebundene NADH-Dehydrogenase (Nuo-Komplex). Anschließend werden die Elektronen von einer sogenannten Transhydrogenase, eine NAD:NADPH-Oxidoreduktase, unter Energieverbrauch von NADH auf NADP übertragen. Da das Redoxpotential des Menachinonpools typischerweise höher liegt als das von NAD, müssen die Elektronen mit Hilfe einer Protonentranslokation durch die energetisierte äußere Membran auf ein höheres Energieniveau gebracht werden. Unter heterotrophen Bedingungen übernehmen diese NADH-Dehydrogenasen häufig die Funktion des Komplexes I der Atmungskette. Im Genom von *K. spormannii* konnten zwei solcher Nuo-Gencluster identifiziert werden (Nuo-Komplex Ia und Nuo-Komplex Ib). Diese beiden homologen Komplexe bestehen in *K. spormannii* jedoch nur aus je 11 Untereinheiten (siehe Abb. 20). Es fehlt die genetische Information für die Untereinheiten NuoE - NuoG. Diese Untereinheiten sind in *E. coli* für eine Bindung des Substrates NAD(H) essenziell. Somit erscheint eine direkte Interaktion der Nuo-Komplexe mit NAD unwahrscheinlich. Darüber hinaus konnte keine Transhydrogenase im Genom von *K. spormannii* detektiert werden, welche für eine Regenerierung von NADPH mittels NADH notwendig wäre. Das Fehlen der *nuoE-G*-Gene wurde ebenfalls für die Nuo-Komplexe von Chloroplasten und einigen Cyanobakterien sowie die der meisten SRBs beschrieben. Obgleich kein eindeutiger experimenteller Nachweis publiziert wurde, wird in der Literatur häufig Ferredoxin als mögliches Substrat dieser aus weniger Untereinheiten bestehenden Nuo-Komplexe postuliert (Battchikova *et al.*, 2011; Berrisford *et al.*, 2016). Interessanterweise konnte das Gen einer Ferredoxin:NADP Reduktase, welche unter beiden autotrophen Bedingungen stark hochreguliert war, unmittelbar vor einem der *nuo*-Gencluster (Ia) verortet werden. Während der *nuo*-Komplex Ia lediglich unter litho- und elektroautotrophen Bedingungen exprimiert wurde, konnte die Expression des Komplexes Ib unter allen drei Wachstumsbedingungen nachgewiesen werden. Dieser war jedoch unter litho- und elektroautotrophen Bedingungen leicht herunterreguliert. Weitere Untersuchungen der Genloki zeigten, dass sowohl die Gene des Komplexes Ia, als auch die oben genannte Ferredoxin:NADP Reduktase unter der Kontrolle des Calvin-Zyklus-Regulators CbbR stehen. Des Weiteren wurde der Transkriptomdatensatz nach möglichen Mechanismen des EETs von der Kathode in den zellulären Chinonpool durchsucht. Hierfür

wurden zunächst alle unter elektroautotrophen Bedingungen im Vergleich zu lithoautotrophen Bedingungen signifikant hochregulierten Gene händisch untersucht.

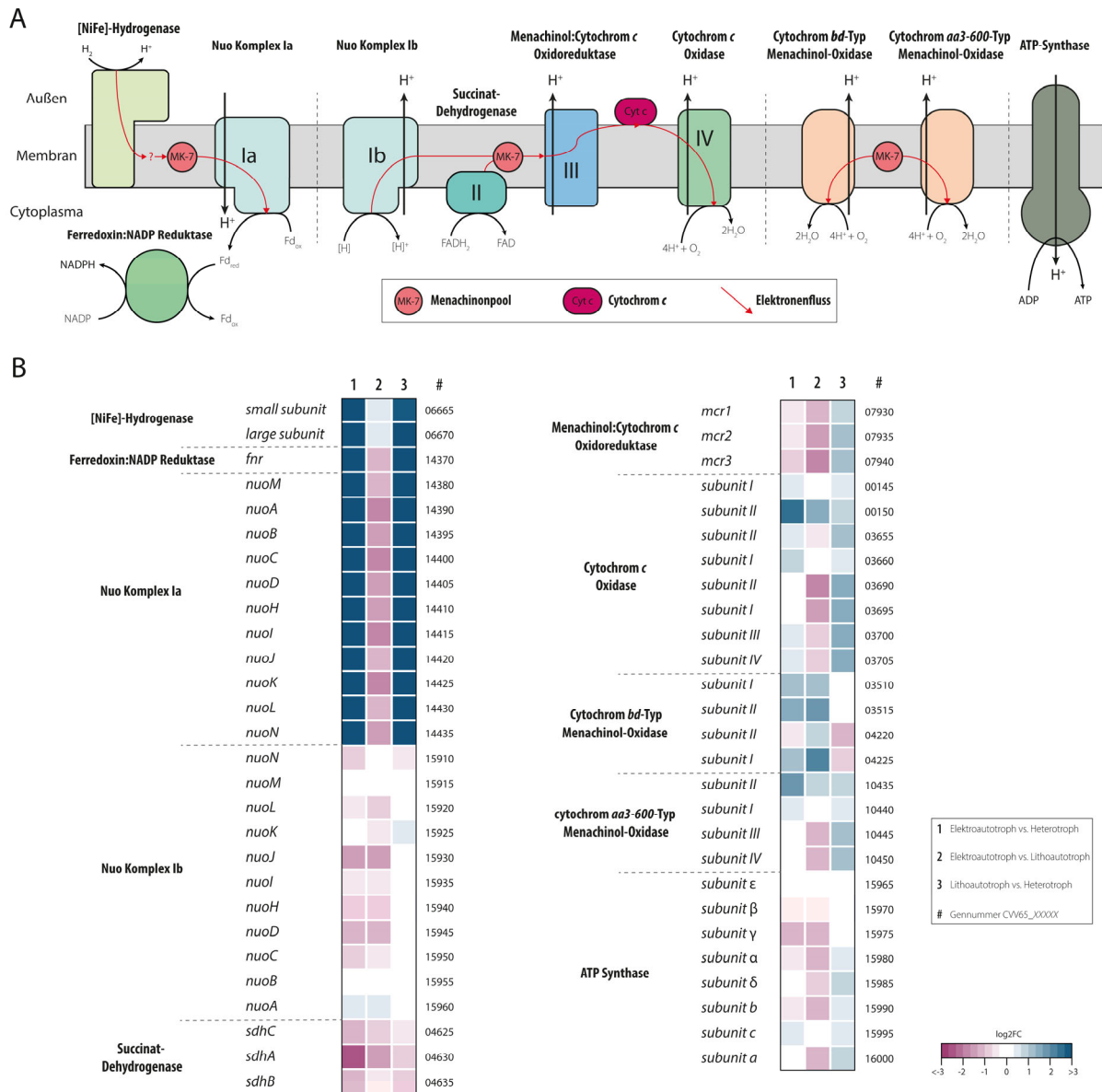


Abb. 20: Schema und vergleichende Expressionsdaten der Energiekonservierung in *K. spormannii*. A. Modell der verzweigten Atmungskette, basierend auf den Daten der Transkriptomanalyse. B. Heatmap der Expressionsänderungen der beteiligten Gene unter den verschiedenen Bedingungen. Eine tabellarische Übersicht der absoluten Expressionswerte (tpm) ist im Appendix auf Seite 146 zu finden.

Insgesamt handelte es sich dabei um 349 signifikant regulierte Gene ($p\text{-Value} < 0,01$; $\log_2\text{FC} > 2$) wovon 129 Gene eine unbekannte Funktion aufwiesen (annotiert als "hypothetical protein"). Auf diesem Wege konnten keine Hinweise auf mögliche EET-Mechanismen von *K. spormannii* erhalten werden. Als die drei am signifikantesten hochregulierten Gene mit bekannter Funktion konnten eine Nukleotidzucker-Dehydrogenase, ein Sporenhüllprotein und Hämerythrin identifiziert werden (siehe auch Tab. 41). Da es sich beim (mulithäm) *c*-Typ-Cytochrom basierten EET um die am besten verstandene und auch häufigste Form des direkten EETs handelt (Siehe Kapitel 17), sollte als

Nächstes diese Möglichkeit der Elektronenaufnahme durch *K. spormannii* evaluiert werden. Hierzu wurden alle exprimierten Gene bestimmt, deren Aminosäuresequenz mindestens eine Häm-Erkennungssequenz (CXXCH) beinhaltet. So konnten 34 unter elektroautotrophen Bedingungen exprimierte c-Typ Cytochrome identifiziert werden. Dabei handelte es sich um 33 Monohäm-Cytochrome und ein Dihäm-Cytochrom (Eine Auflistung ist auf Seite 147 des Appendix abgedruckt). Bei den am EET anderer Organismen beteiligten c-Typ Cytochromen handelt es sich jedoch typischerweise um Multihäm-Cytochrome, welche nicht selten bis zu 10 kovalent gebundene Häm-Gruppen enthalten. Zwei der identifizierten c-Typ Cytochrome waren unter elektroautotrophen Bedingungen signifikant hochreguliert ($p\text{-Value} < 0,01$; $\log_2\text{FC} > 2$). Die allerdings vernachlässigbare geringe absolute Expression macht eine Beteiligung am EET äußerst unwahrscheinlich (siehe Tab. 41). Daher wurde als weitere Möglichkeit des EETs das Genom von *K. spormannii* mittels BLAST-Analyse nach Schlüsselgenen des kürzlich beschriebenen EET-Mechanismus von *L. monocytogenes* (siehe Seite 17ff.) durchsucht. Dabei konnten keine Gene mit signifikanter Homologie gefunden werden (siehe Appendix auf Seite 148). Zusammenfassend kann an dieser Stelle vermerkt werden, dass anhand der Genom- und Transkriptomdaten keine Hinweise auf einen direkten Elektronentransfer von einer Kathode erlangt werden konnten. Aus diesem Grund sollten nun indirekte Elektronenaufnahmemechanismen näher in Betracht gezogen werden. Da keine vollständigen Synthesewege zur Exkretion von Flavinen oder Phenazinen als endogene Elektronenshuttles im Genom aufgefunden werden konnten, wurde die Möglichkeit einer indirekten Elektronenaufnahme via Hydrogenasen oder Formiatdehydrogenasen untersucht. Während keine Änderung in der Expression einer ohnehin schwach exprimierten Formiat-Dehydrogenase nachgewiesen werden konnte, zeigten beide Untereinheiten der [NiFe]-Hydrogenase eine starke positive Regulation unter lithoautotrophen und elektroautotrophen Wachstumsbedingungen ($p\text{-Value} < 0,01$; $\log_2\text{FC} > 3,5$). Obwohl die absolute Expression unter elektroautotrophen Bedingungen ebenfalls höher ausfiel als unter lithoautotrophen Bedingungen, konnte diese Expressionsänderung nicht als signifikant eingestuft werden ($p\text{-Value} > 0,05$). Beide Hydrogenase-Untereinheiten konnten jedoch den 40 am höchsten exprimierten Genen unter elektroautotrophen Bedingungen zugeordnet werden. Zusammenfassend kann anhand der bisher durchgeführten Untersuchungen ein direkter EET weitestgehend ausgeschlossen werden. Auf Grund der Datenlage der Transkriptomanalyse scheint eine Beteiligung der [NiFe]-Hydrogenase am EET-Mechanismus von *K. spormannii* hingegen als sehr wahrscheinlich.

Im letzten Teil der Transkriptomanalyse sollte das Atmungskettenmodell vervollständigt werden und die Gene derer Komponenten identifiziert werden, welche an der terminalen Reduktion von Sauerstoff mit Elektronen aus dem Chinonpool beteiligt sind. Anhand der identifizierten Gene wurde das Modell einer verzweigten Atmungskette aufgestellt (siehe Abb. 20): Aus dem Chinonpool können Elektronen entweder über Komplex III und IV einer „klassischen“ Cytochrom *c*-basierten Atmungskette oder direkt mittels zweier unterschiedlicher Menachinioxidasen (Cytochrom *bd*-Typ und Cytochrom *aa3-600*-Typ) auf Sauerstoff übertragen werden. Während Letztere unter elektroautotrophen Bedingungen leicht hochreguliert waren, zeigt Komplex III (Menachinon: Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase) eine geschwächte Expression unter elektroautotrophen Bedingungen.

Tab. 41: Zusammenfassung der Expressionsdaten einiger ausgewählter Gene. Log2FC mit einem p-Value > 0,01 wurden durch Sternchen ersetzt.

Gennummer CVV65_x	Annotierte Funktion	Log2FC	Log2FC	Log2FC	Absolute
		Elektroautotroph vs. Heterotroph	Lithoautotroph vs. Heterotroph	Elektroautotroph vs. Lithoautotroph	Expression (tpm) Elektroautotroph
<i>Calvin-Zyklus</i>					
14330	Regulator (<i>cbbR</i>)	4,3	5,4	*	29,4 ± 11,9
14355	RuBisCO große Untereinheit (<i>rbcl</i>)	7,6	9,1	*	281,5 ± 51,9
14360	RuBisCO kleine Untereinheit (<i>rbcs</i>)	8,3	9,8	*	190,4 ± 51,9
<i>Potenzielle EET-Mechanismen</i>					
06665	[NiFe]-Hydrogenase große Untereinheit	4,2	3,6	*	419,1 ± 37,7
06668	[NiFe]-Hydrogenase kleine Untereinheit	4,2	3,6	*	323,4 ± 40,4
10705	Formiat-Dehydrogenase 1	*	*	*	6,4 ± 0,7
12375	Formiat-Dehydrogenase 2	3,5	*	*	4,3 ± 0,2
11325	<i>hypothetical c</i> -Typ Cytochrom	4,0	*	2,8	7,8 ± 3,5
04230	<i>hypothetical c</i> -Typ Cytochrom	2,0	*	2,3	4,0 ± 0,3
<i>Am höchsten exprimierte Gene (annotiert) Elektroautotroph vs. Autotroph</i>					
10155	Nukleotidzucker-Dehydrogenase	1,7	*	12,2	45,0 ± 15,7
06775	Sporenhüllprotein (<i>cotJB</i>)	8,5	*	9,0	20,0 ± 8,4
03775	Hämerythrin	10,1	*	7,6	78,7 ± 62,9

3.7 Eisenkorrosionsexperiment

Im Rahmen der durchgeführten Transkriptomanalyse konnten keine Hinweise auf einen direkten EET von einer Kathode nach bereits bekannten Mechanismen erlangt werden. Die hohe Expression der [NiFe]-Hydrogenase unter elektroautotrophen Bedingungen suggeriert hingegen eine indirekte Elektronenaufnahmeroute unter Beteiligung

derselbigen Hydrogenase. Anhand der Transkriptomdaten kann jedoch nicht abschließend geklärt werden, ob diese Hydrogenase unter elektroautotrophen Wachstumsbedingungen (a) dazu in der Lage ist, kathodische Elektronen direkt aufzunehmen und in den Menachinonpool zu übertragen oder (b) an der Kathode abiotisch entstehenden Wasserstoff als Elektronendonator nutzt oder (c) eine enzymbasierte Wasserstoffentstehung an der Kathode katalysiert. Daher sollte ein Eisenkorrosionsexperiment nach Deutzmann *et al.* durchgeführt werden, um so die korrosiven (wasserstoffgenerierenden) Eigenschaften von zellfreiem Überstand einer stationären *K. spormannii*-Kultur gegenüber einem unlöslichen Elektronendonator (elementares Eisen, $E^{\circ}(\text{Fe}(0)/\text{Fe}^{2+}) = -440 \text{ mV vs. SHE}$) zu bestimmen (Deutzmann *et al.*, 2015). Deutzmann und Kollegen konnten so die enzymkatalysierte Wasserstoffentstehung an Kathoden als primären EET-Mechanismus von *Methanococcus maripaludis* und *Sporomusa sphaeroides* identifizieren. Für diese Organismen wurde häufig ein direkter EET während des kathodischen Wachstums oder bei Wachstum auf elementarem Eisen als Elektronendonator postuliert. Dies wurde stets durch einen unter diesen Bedingungen fehlenden Wasserstoffnachweis begründet. Deutzmann *et al.* konnten jedoch zeigen, dass eine deutliche Wasserstoffentstehung an elementarem Eisen oder Kathoden in zellfreiem Gebrauchtmedium gemessen werden kann. Nach Hitzeinaktivierung des Zellüberstandes konnte hingegen keine Wasserstoffentwicklung mehr detektiert werden. Auch in Zellüberstand von Hydrogenase-Deletionsmutanten der beiden Spezies konnte keine Wasserstoffentstehung gemessen werden. Dies lässt darauf schließen, dass in *M. maripaludis* und *S. sphaeroides* freie Hydrogenasen (vermutlich aus lysierten Zellen) eine Wasserstoffentstehung an unlöslichen Elektronendonoren katalysieren. In dieser Arbeit sollte dieses Experiment in veränderter Form mit *K. spormannii* durchgeführt werden. So sollte die Wasserstoffentstehung an elementarem Eisen durch unbehandelte und autoklavierte *K. spormannii*-Kulturen, sowie durch unbehandelten und autoklavierten Zellüberstand dieser Kulturen untersucht und mit der Wasserstoffentstehung gleichbehandelter *K. tusciae*-Kulturen verglichen werden. In einem mikrobiellen Elektrosynthesereaktor katalysiert *K. tusciae* deutlich geringere reduktive Stromdichten, als *K. spormannii* (siehe Reiner 2019, Manuskript im Anhang). Beide Spezies wurden autotroph in ES-Medium kultiviert (pH 3,5; 60 °C). Als Negativkontrolle diente steriles ES-Medium (sowohl ohne als auch mit Zugabe von Eisengranula). Unbehandelter Zellüberstand einer *M. maripaludis*-Kultur (in Methanococcus-Medium, 30 °C) diente als Positivkontrolle zur Überprüfung der Messroutine. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abb. 21 zusammengefasst. Nach 7 Tagen konnten in der Gasphase der Positivkontrolle ca. 0,35 % Wasserstoff gemessen werden. Die Negativkontrolle ohne Eisengranula (ES-Medium) zeigte hingegen keine Wasserstoffentstehung. Überraschenderweise betrug der

Wasserstoffgehalt in der Gasphase der Negativkontrolle mit Eisengranula ca. 1 %. Auch unter allen übrigen getesteten Bedingungen konnte eine Wasserstoffkonzentration von ca. 1 % gemessen werden. So konnten unter den gewählten Bedingungen keine signifikanten Unterschiede der Wasserstoffentstehung zwischen *K. spormannii* und *K. tusciae* gemessen werden. Darüber hinaus konnte der Hitzebehandlung der Proben keinen Einfluss auf die Wasserstoffentstehung zugesprochen werden.

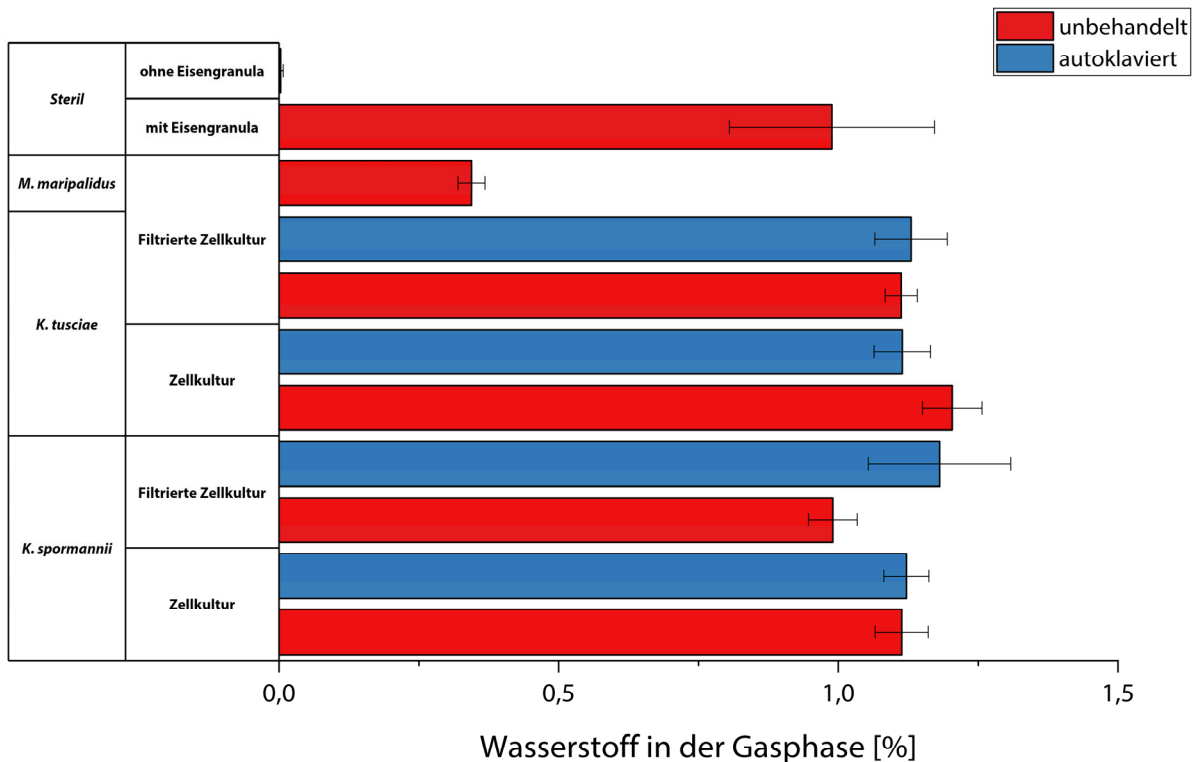


Abb. 21: Gemessener Wasserstoffanteil in der Gasphase der mit Eisengranula versetzten Kulturflaschen (in Vol%). Uninokuliertes ES-Medium (60 °C) („Steril“) diente als Negativkontrolle. Zellfreier Zellüberstand einer *M. maripalidis*-Kultur (30 °C, *Methanococcus*-Medium) diente als Positivkontrolle. Es konnte kein signifikanter Unterschied im Wasserstoffgehalt inokulierter ES-Medien-Ansätze (60 °C) gegenüber der sterilen Negativkontrolle mit Eisengranula (ES-Medium, 60 °C) detektiert werden. Aus der Hitzebehandlung der Proben resultierte ebenfalls kein signifikanter Effekt auf die Wasserstoffentstehung.

Die Ergebnisse des Eisenkorrosionsexperimentes zeigen deutlich, dass eine abiotische Wasserstoffentstehung an einem unlöslichen Elektronendonator unter den gewählten Bedingungen (ES-Medium, pH 3,5 und 60 °C) bereits bei einem Potential von -440 mV vs. SHE auftreten kann. Da unter elektroautotrophen Kultivierungsbedingungen von *K. spormannii* ein Potential von -500 mV vs. SHE gewählt wurde, kann auch unter diesen Bedingungen von einer abiotischen Wasserstoffproduktion an der Kathode ausgegangen werden. Dennoch konnte zu Beginn dieser Arbeit ein biotischer Effekt beim Vergleich der Stromdichten zwischen einem beimpften und sterilen Elektrosynthesereaktor detektiert werden. Ob dieser Effekt tatsächlich auf einer biologischen Aktivität der kathodischen *K. spormannii*-Zellen beruht, sollte in einem Atmungsketteninhibitoren-Experiment im mikrobiellen Elektrosynthesereaktor überprüft werden.

3.8 Einfluss von Atmungsketteninhibitoren auf die Stromdichte in einem Elektrosynthesereaktor

Einem mit *K. spormannii* inokulierten Elektrosynthesereaktor wurden nacheinander verschiedene, gängige Atmungsketteninhibitoren (je 100 μM Endkonzentration) zugegeben, um so deren Einfluss auf die reduktive Stromdichte des bioelektrochemischen Systems zu ermitteln. Während die Zugabe von Rotenon und Antimycin A keinen Einfluss auf die gemessene Stromstärke zeigte, konnte nach der Zugabe von CCCP (Carbonylcyanid-*m*-chlorphenylhydrazon) ein deutlicher Abfall der Stromstärke detektiert werden (siehe Abb. 22). Während Rotenon und Antimycin A vor der Zugabe in DMSO gelöst wurden, musste CCCP in Ethanol in Lösung gebracht werden. Da Ethanol, wie auch andere primäre Alkohole, für eine Vergiftung von Platinelektroden verantwortlich sein können, wurde eine zusätzliche Negativkontrolle durchgeführt: So wurde inokulierten Elektrosynthesereaktoren die gleiche Menge reines Ethanol zugeführt. Dabei konnte jedoch keine Änderung der Stromstärke gemessen werden.

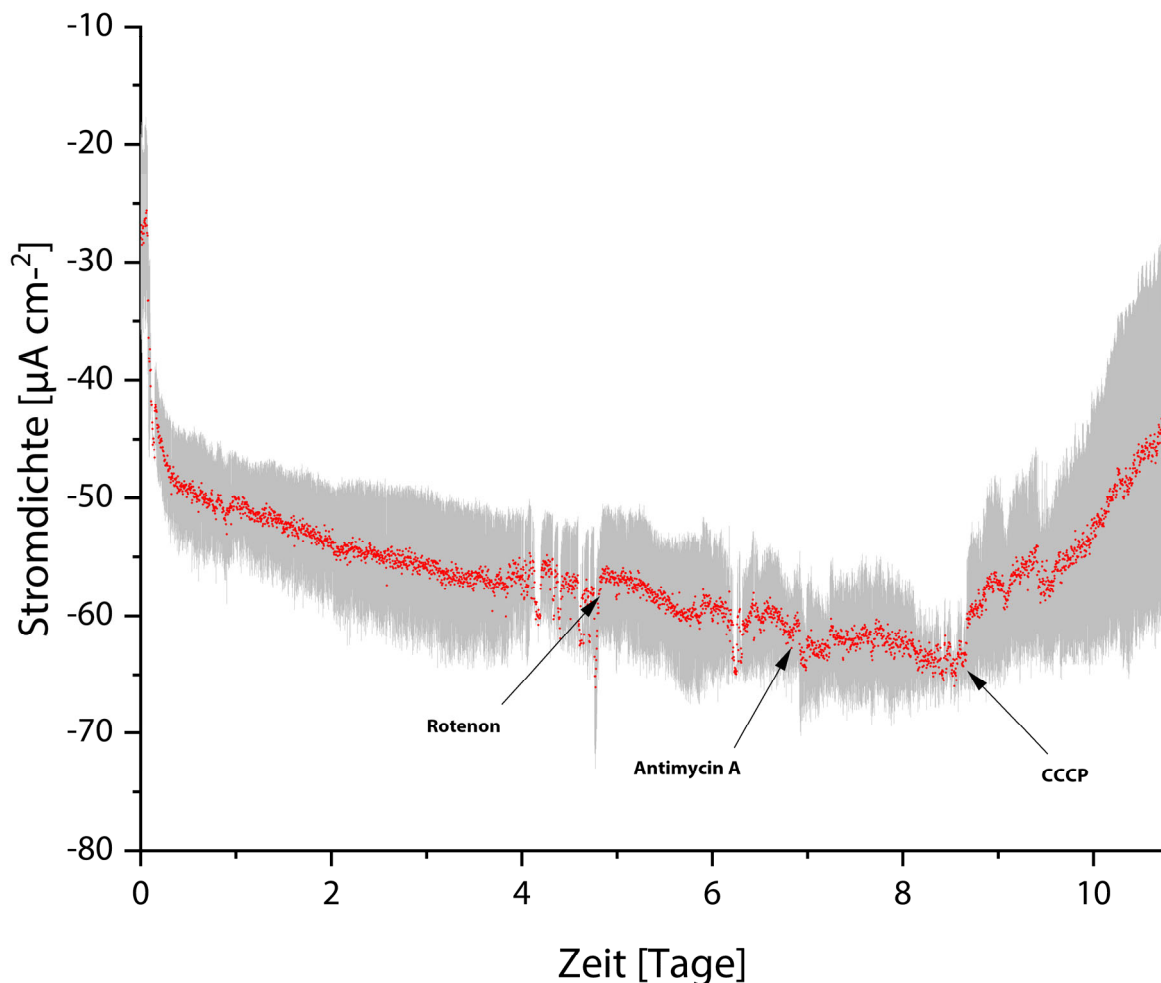


Abb. 22: Einfluss verschiedener Atmungsketteninhibitoren auf den Stromverbrauch eines mit *K. spormannii* inokulierten Elektrosynthesereaktors (-500 mV vs. SHE). Die finale Konzentration der Inhibitoren betrug 100 μM .

3.9 Kultivierung von *K. spormannii* in bedruckbaren Fließzellen

Im Vergleich zu anodischen Biofilmen sind die kathodischen Biofilme mikrobieller Elektrosynthesysteme typischerweise durch eine geringe Dicke von oftmals nur einer oder wenigen Zellschichten geprägt. Auch die in dieser Arbeit beschriebenen *K. spormannii*-Biofilme aus den verwendeten 2-Liter-Elektrosynthesereaktoren waren durch solch einen einschichtigen Biofilm charakterisiert (Abb. 16). Die Steigerung von Umsatzraten in der mikrobiellen Elektrosynthese durch eine Erhöhung der Biofilmdicke gilt als ein entscheidender Schritt, um den Prozess der mikrobiellen Elektrosynthese zu einer markt- und wettbewerbsfähigen CCU-Technologie zu entwickeln. Eine Substratlimitation der gasförmigen Edukte – im Falle eines Knallgasbakterium CO_2 und O_2 - könnte eine solche Limitierung des Biofilmwachstums zur Folge haben, insbesondere unter den in dieser Arbeit gewählten, thermoacidophilen Bedingungen, da hier - auf Grund der hohen Temperatur und des niedrigen pH-Wertes - die Löslichkeit dieser beiden Gase besonders gering ausfällt. Dem sollte durch eine Bedruckung eines bioelektrochemischen Systems als eine reaktorseitige Strategie zur Steigerung des Biofilmwachstums von *K. spormannii* entgegengewirkt werden. Für diesen Zweck wurde im Rahmen einer engen, interdisziplinären Kooperation eine spezielle, bioelektrochemische Fließzellperipherie durch Verfahrensingenieure des Engler-Bunte-Institutes am KIT entwickelt. Der genaue Aufbau dieser Fließzellen kann Abb. 7 im Material und Methoden Teil dieser Arbeit entnommen werden. Die gesamte Fließzellperipherie fasste ca. einen Liter ES-Medium. Das Volumen der eigentlichen Fließzelle betrug hingegen 50 ml. Das Medium wurde in einem integrierten, doppelwandigen Edelstahlkessel auf konstanter Temperatur gehalten. Die Gasphase dieses Edelstahlkessels wurde in allen folgenden Versuchen auf 1,5 bar bedruckt. Das im Kessel enthaltene Medium wurde zusätzlich mit Hilfe eines Magnetrührers mit dem CO_2/O_2 -Gasmisch der Gasphase angereichert und anschließend mittels einer Magnetzahnradpumpe mit einer Geschwindigkeit von 100 ml min^{-1} durch die Fließzellen gepumpt. Hierdurch sollte eine bessere Versorgung des kathodischen Biofilms mit den Substraten CO_2 und O_2 gewährleistet werden. Das Biofilmwachstum wurde anhand von OCT-Aufnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten über einen Zeitraum von 10 Tagen aufgezeichnet. Die analysierte Fläche betrug $8 \times 4 \text{ mm}$ und befand sich in der Mitte des Flusskanales und auch in der Mitte der Graphitkathode (Abb. 23A). Das kathodische Wachstum von *K. spormannii* bei einem Potential von -500 mV vs. SHE wurde mit der Biofilmentwicklung auf einer OCP-Kontrollkathode verglichen. Eine unbeimpfte Fließzelle diente als weitere Kontrolle.

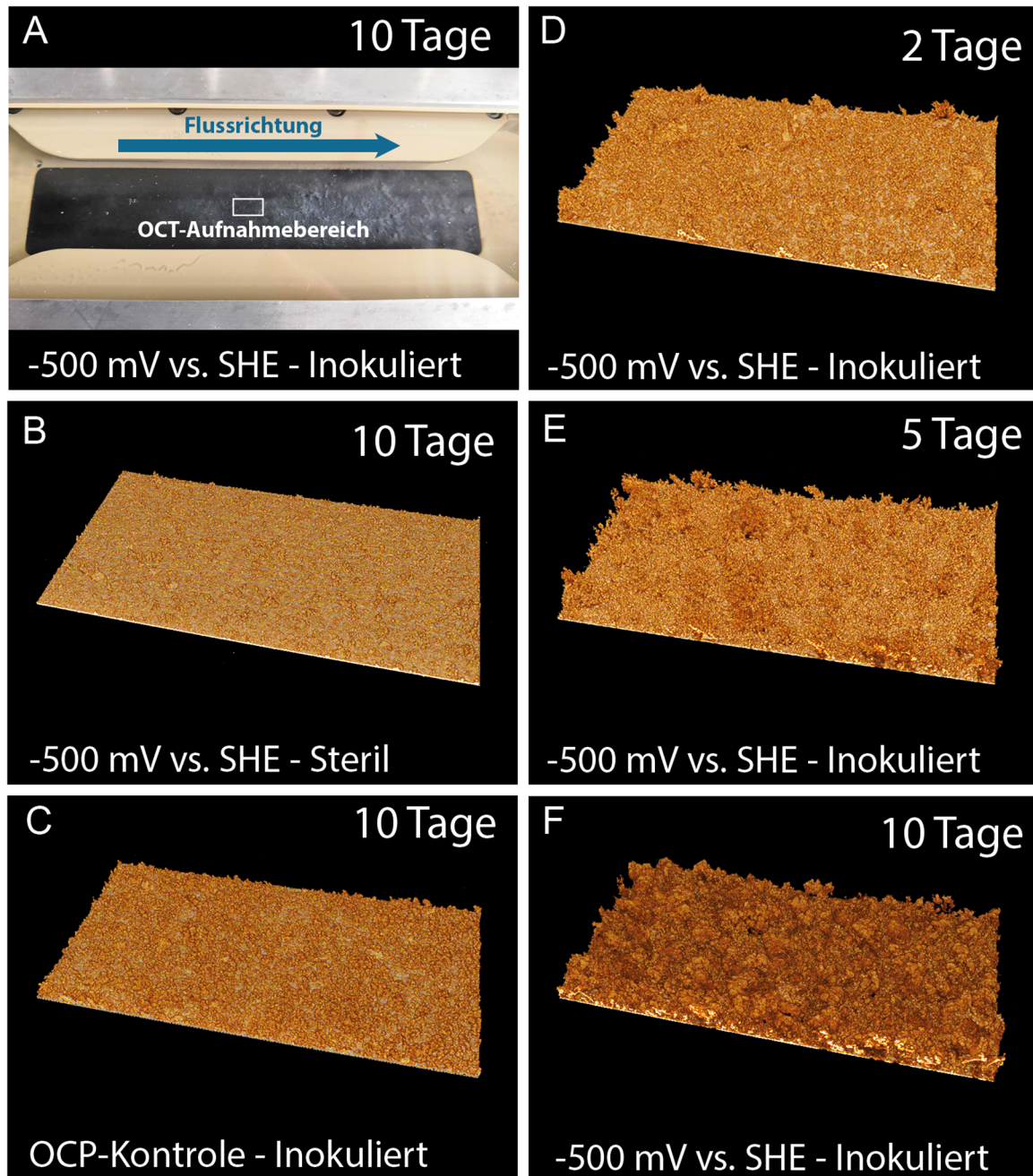


Abb. 23: 3D-Rekonstruktionen der OCT-Datensätze aus unterschiedlichen Fließzellexperimenten. Die abgebildete Fläche entspricht 8×4 mm der Kathodenoberfläche. A. Fotografie des kathodischen Biofilms nach 10 Tagen Inkubation (Foto: Tobias Jung). B. abiotische Kontrolle C. OCP-Kontrolle DEF. Entwicklung des kathodischen Biofilms nach 2 (D) 5 (E) und 10 (F) Tagen.

Während die Kontrollkathoden (Abb. 23B,C) nach 10 Tagen lediglich von einer niederschlagsähnlichen Textur mit geringem Bedeckungsgrad überzogen waren, konnte auf den mit Potential beaufschlagten Kathoden die Entwicklung einer durchgängigen dreidimensionalen Biofilmstruktur mit einer durchschnittlichen Höhe von $80 \mu\text{m}$ nach 10 Tagen detektiert werden (Abb. 23D,E,F). In Abb. 23A ist diese Struktur mit bloßem Auge als ein grauer Schleier auf der sonst schwarzen Graphitkathode erkennbar. Zur mikroskopischen Untersuchung wurde der Fließzelle eine Probe dieser Struktur

entnommen, einer Nilrotfärbung unterzogen und auf einen Objektträger aufgebracht. Abb. 24 zeigt Phasenkontrast- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der kathodischen Materialproben. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse bestätigte die Annahme, dass es sich um einen Biofilm aus *K. spormannii*-Zellen handelt, welcher in einer unidentifizierten, jedoch in den Phasenkontrastaufnahmen sichtbaren, Matrix eingebettet war. Mit Hilfe der Nilrotfärbung konnten darüber hinaus intrazelluläre PHB-Granula im kathodischen Biofilm nachgewiesen werden (siehe Pfeile in Abb. 24).

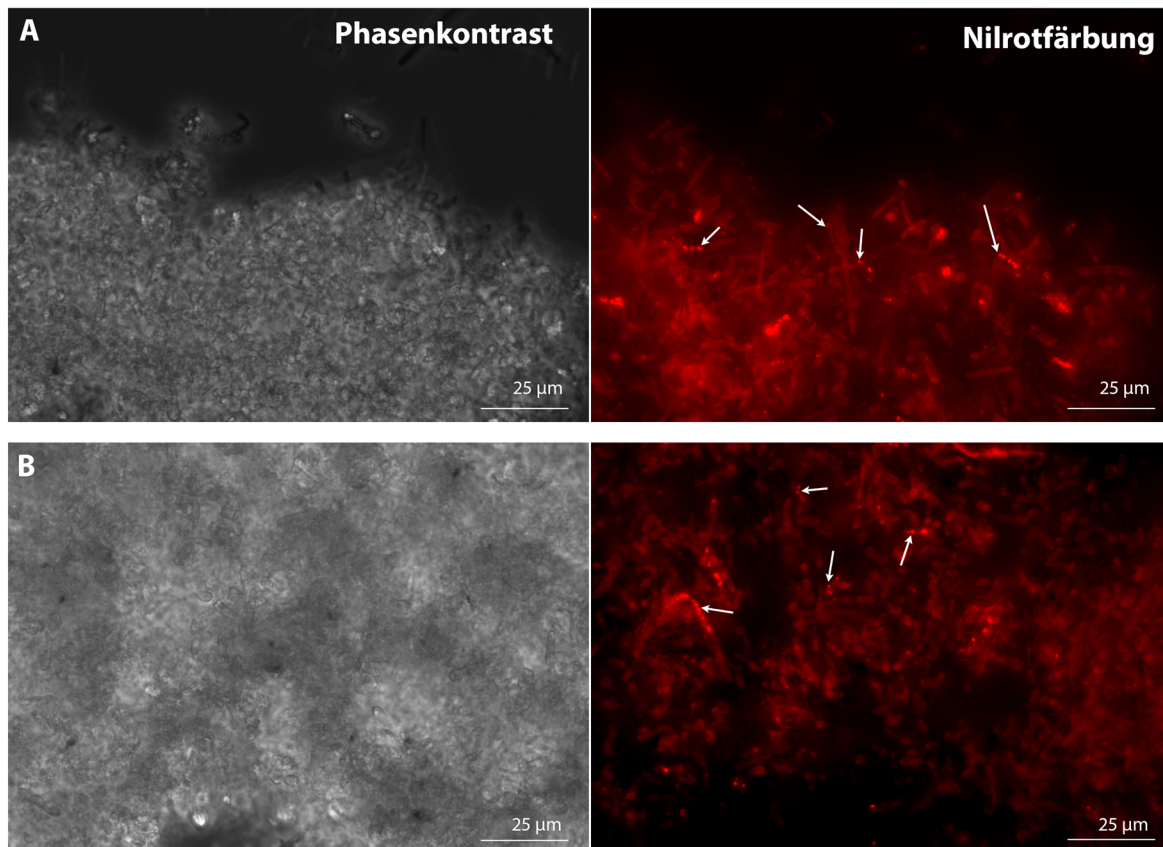


Abb. 24: Phasenkontrast- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der nilrotgefärbten Biofilmproben aus der mit Potential beaufschlagten Fließzelle. Die weißen Pfeile kennzeichnen exemplarisch intrazelluläre PHB-Granula im kathodischen Biofilm.

Zum weiteren Nachweis des zellulären Aufbaus des kathodischen Biofilms wurde die Kathode einer mit Druck und Potential beaufschlagten Fließzelle nach 10 Tagen Inkubation umgehend aus dem System ausgebaut und der kathodische Biofilm mit *Lowmelt*-Agarose überschichtet. Die Agaroselösung enthielt zusätzlich die Fluoreszenzfarbstoffe Nilrot und *BacLight RedoxSensor Green*. Bei letzterem handelt es sich um einen membrangängigen Viabilitätsindikator, welcher nach intrazellulärer Reduktion ein stabiles grünes Fluoreszenzsignal emittiert. Mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie konnte so eine *in situ* Aufnahme des kathodischen Biofilms aufgezeichnet werden (siehe Abb. 25A). Dessen Aufbau aus mehreren Zellschichten ist deutlich erkennbar. Die PHB-Einlagerung in Form

von intrazellulären Granula konnte auch in dieser Konfokalmikroskopie-Analyse nachgewiesen werden (siehe Abb. 25B).

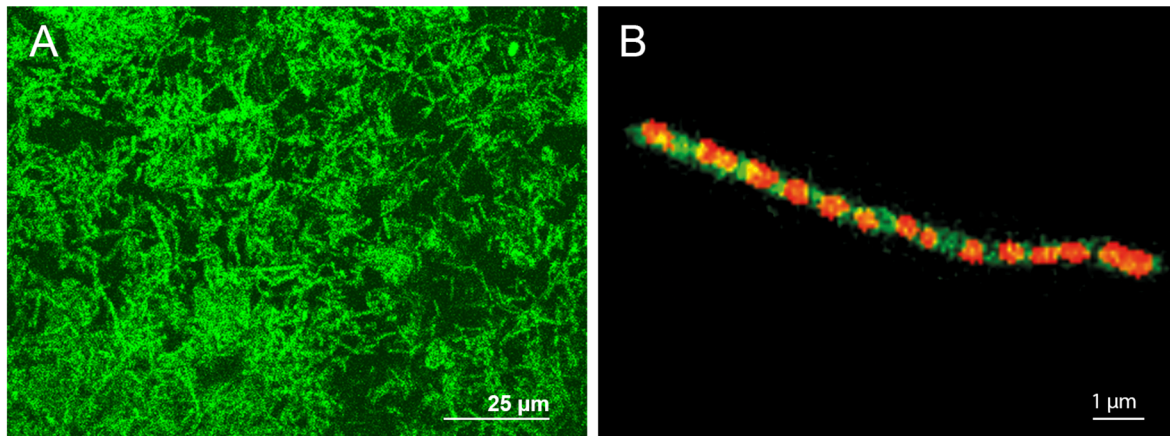


Abb. 25: Konfokale *in situ* Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen der Kathode einer mit Druck und Potential beaufschlagten Fließzelle. A. Übersichtsaufnahme des mit dem Viabilitätsfarbstoff RedoxSensor Green gefärbten kathodischen Biofilms. B. Detailaufnahme einer einzelnen *Kyrpidia*-Zelle aus dem Biofilm. Die Zelle zeigt deutliche mit Nilrot gefärbte PHB-Einschlüsse.

3.10 ^{13}C -Inkorporationsexperiment

Als finaler Nachweis der kathodischen CO_2 -Fixierung von *K. spormannii* sollte eine Kohlenstoffisotopenanalyse des Fließzellbiofilms durchgeführt werden. Eine Übersicht über den experimentellen Verlauf des Versuches kann Abb. 26 entnommen werden. Als Inokulum der Fließzelle diente eine lithoautotroph gewachsene *K. spormannii*-Vorkultur, welcher ^{13}C -markiertes CO_2 als alleinige Kohlenstoffquelle diente.

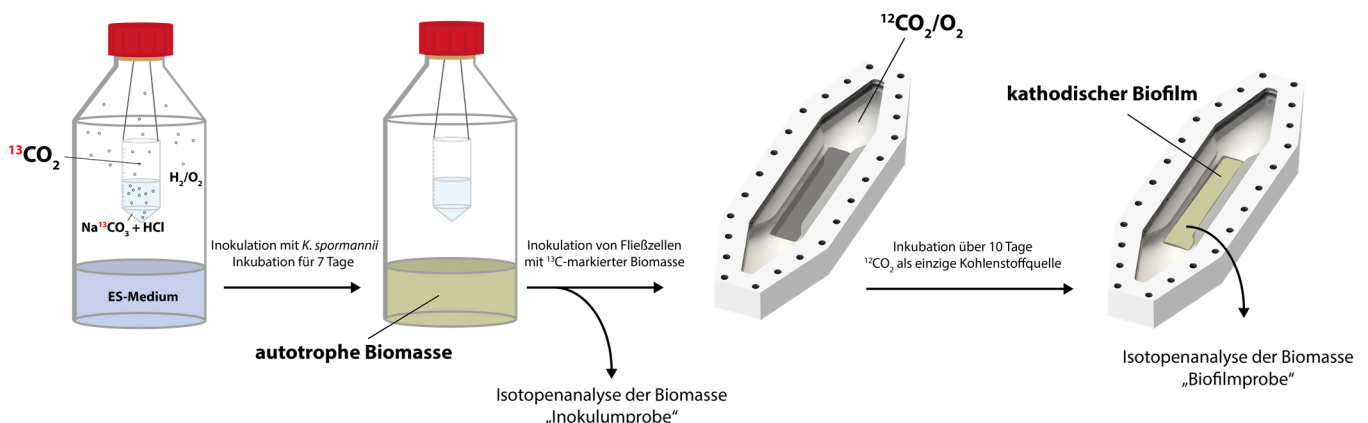


Abb. 26: Schematische Übersicht des experimentellen Verlaufes des Kohlenstoffisotopenexperimentes zur Bestätigung der kathodischen CO_2 -Fixierung durch *K. spormannii*.

Die Bestimmung des Kohlenstoffisotopenverhältnis der Biomasse des Inokulums zeigte ein hohes ^{13}C zu ^{12}C Verhältnis von 5,3 (at% ^{13}C /at% ^{12}C). Der absolute Gehalt an ^{13}C -markiertem Kohlenstoff in der Biomasse der Vorkultur betrug 85,3 at% $^{13}\text{C}/\text{C}_{\text{ges}}$. Anschließend wurde eine mit Potential beaufschlagte Fließzelle mit dieser Vorkultur inokuliert. Im Gegensatz zur ^{13}C -markierten Kohlenstoffquelle der Vorkultur diente reguläres $^{12}\text{CO}_2$ als alleinige

Kohlenstoffquelle während des kathodischen Wachstums. Hierdurch wäre bei einer positiven CO_2 -Fixierung des kathodischen Biofilms eine Änderung des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis in der Biomasse des Biofilms zu erwarten. Abb. 28 zeigt das gemessene Isotopenverhältnis der Biomasse des kathodischen Biofilms im Vergleich zur Biomasse der Vorkultur. Dabei ist eine deutliche Abnahme des ^{13}C -Gehaltes in der Biomasse des Biofilms ($\text{at}\% \text{ } ^{13}\text{C}/\text{at}\% \text{ } ^{12}\text{C} = 0,53$) zu beobachten. Somit konnte mit der Durchführung dieses ^{13}C -Inkorporationsexperiment ein erfolgreicher Nachweis der kathodischen CO_2 -Fixierung durch *K. spormannii* erbracht werden.

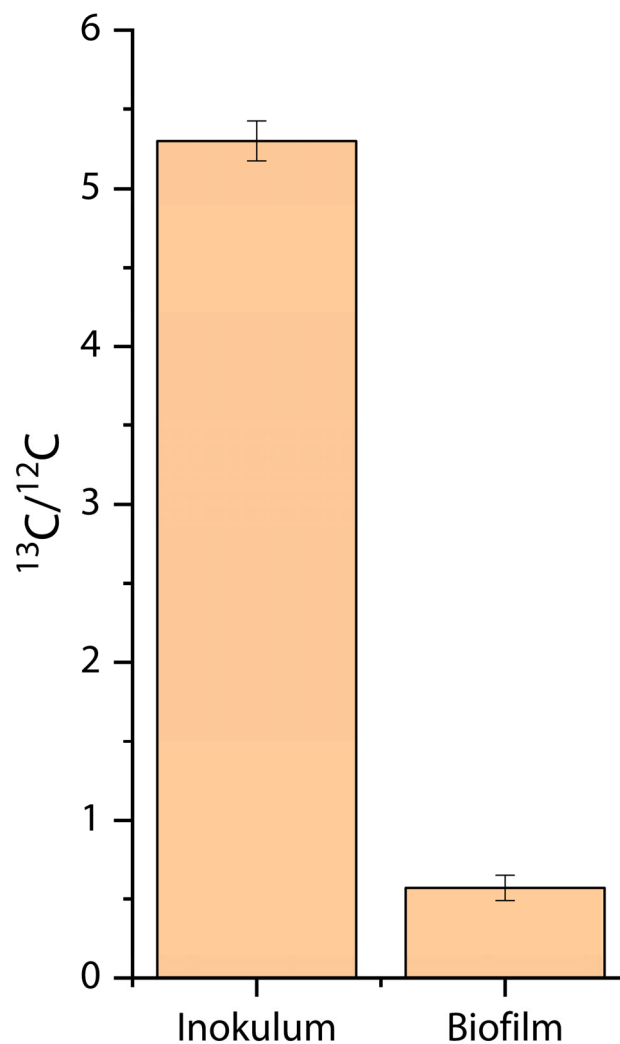


Abb. 27: Kohlenstoffisotopenverhältnisse der Biomasse des kathodischen Biofilms und des Inokulums.

3.11 Untersuchungen zur Eignung von Rauchgas als Substrat für das autotrophe Wachstum von *K. spormannii*.

Sämtliche bisher gezeigten Versuche zum autotrophen Wachstum von *K. spormannii* wurden auf Grund der höheren Reproduzierbarkeit anhand von kommerziell erhältlichem

(und somit hochreinem) CO_2 als Kohlenstoffquelle durchgeführt. Als ein entscheidender Vorteil der Nutzung eines thermoacidophilen Knallgasbakteriums zur großtechnischen CO_2 -Konversion, kann dessen Sauerstoffabhängigkeit sowie die Fähigkeit zu Wachstum bei erhöhter Temperatur und niedrigem pH-Wert genannt werden - vor allem in Anbetracht der Tatsache, dass die meisten großen CO_2 -Emissionsquellen heiße, sauerstoffhaltige Abgase emittieren, welche häufig durch säurebildende Substanzen, wie zum Beispiel Schwefeloxide, verunreinigt sind. Daher sollte in einem ausblickenden, letzten Experiment dieser Arbeit die Fähigkeit von *K. spormannii* einen realen CO_2 -Abgasstrom als alleinige Kohlenstoffquelle zu nutzen, überprüft werden.

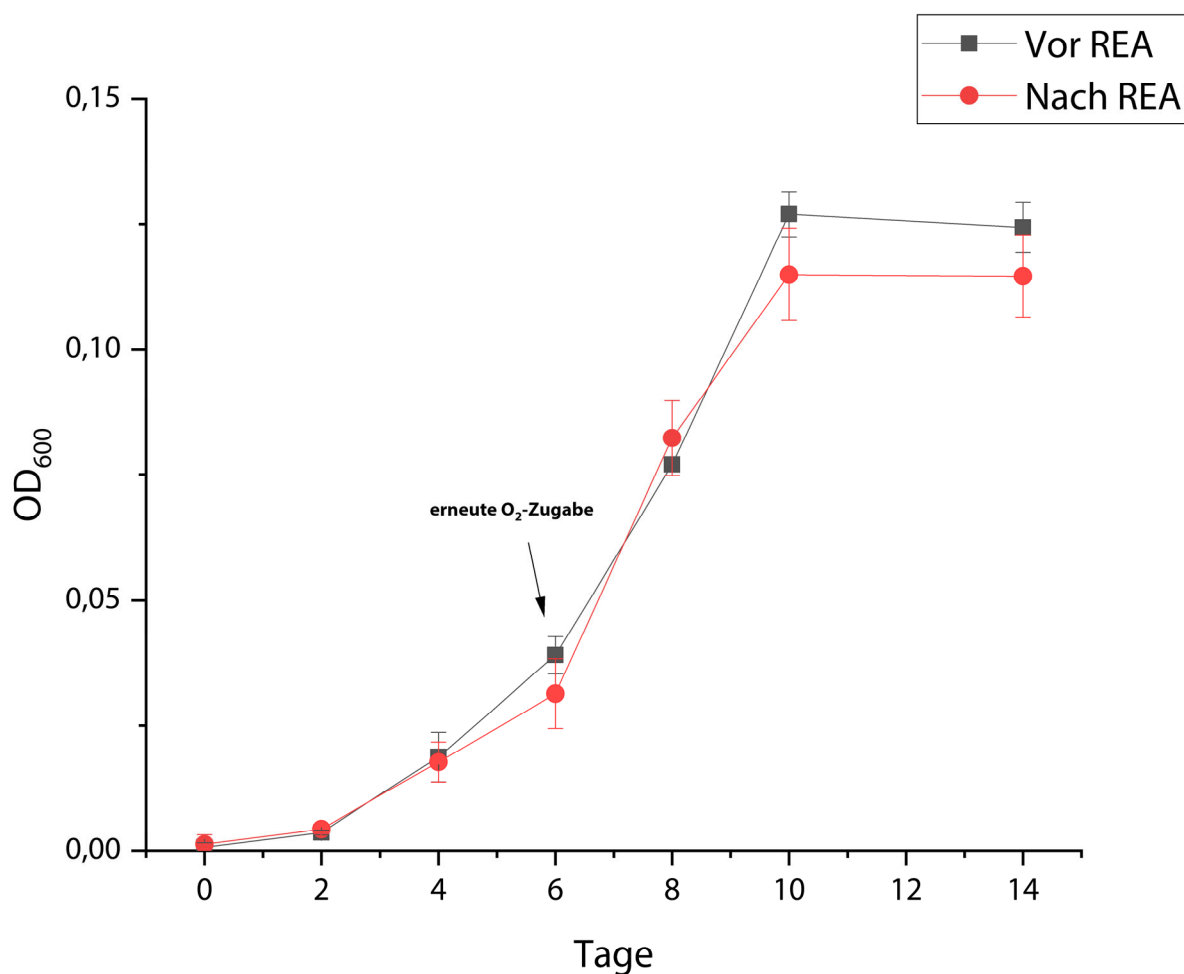


Abb. 28: Wachstumskurve des lithoautotrophen Wachstums von *K. spormannii* auf Rauchgas eines Kohledampfkraftwerkes als alleinige Kohlenstoffquelle. REA, Rauchgasentschwefelungsanlage.

Als exemplarischer CO_2 -Abgasstrom wurden Rauchgasproben des steinkohlebetriebenen Rheinhardendampfkraftwerks der ENBW in Karlsruhe gewählt. Dem Saugzug (Abgasleitung nach der Kohleverbrennung, welche die Rauchgase durch den Schornstein des Kraftwerks in die Umwelt abführt) wurden an zwei unterschiedlichen Stellen gasförmige Proben entnommen. Eine Probeentnahmestelle befand sich vor, die Andere nach der sogenannten

Rauchgasentschwefelungsanlage (REA). Dabei handelt es sich um die primäre Rauchgasaufbereitung zur Entfernung von Schwefelverbindungen. Die Zusammensetzung beider Proben wurde mittels Gaschromatographie analysiert. So betrug der CO_2 -Gehalt beider Proben 15 %, die Sauerstoffkonzentration betrug in beiden Proben 5 %. Die Rauchgasproben dienten (unter Zugabe von Wasserstoff als Elektronendonator) als Gasphase einer mit ES-Medium gefüllten Kulturglasflasche, welche im Anschluss mit *K. spormannii* inokuliert wurde. Die optische Dichte der lithoautotrophen Kulturen über einen Zeitraum von 14 Tagen kann Abb. 28 entnommen werden. Nach 6 Tagen Inkubation bei 60 °C wurde den Kulturen mittels einer Spritze mit vorgeschraubtem Sterilfilter neuer Luftsauerstoff (100 ml Luft \triangleq 20 ml O_2) zugegeben. Die Wachstumskurven der Kulturen sind nicht von lithoautotrophen Wachstumskurven auf gereinigtem CO_2 zu unterscheiden (Reiner, 2015). Interessanterweise konnte auch zwischen den unterschiedlichen Rauchgasproben kein signifikanter Unterschied in Wachstumsrate und maximaler Zelldichte nachgewiesen werden. *K. spormannii* kann somit die Fähigkeit zugesprochen werden, unbehandeltes Rauchgas als alleinige Kohlenstoffquelle für ein autotrophes Wachstum nutzen zu können.

IV. DISKUSSION

Mit dieser Dissertationsarbeit konnte eine mehrjährige Isolationskampagne zur Entdeckung neuartiger Biokatalysatoren zur kathodischen CO₂-Reduktion abgeschlossen werden. So konnte eine neue Art, *Kyrpidia spormannii* EA-1^T, entdeckt und eingehend charakterisiert werden. Es handelt sich dabei um den ersten Organismus, dem eine wachstumsgekoppelte, CO₂-Fixierung unter elektroautotrophen Bedingungen nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus wurden in dieser Arbeit die ersten Transkriptomdaten einer unter elektroautotrophen Bedingungen kultivierten Reinkultur erfasst. So konnte während des kathodischen Wachstums eine im Vergleich zu heterotrophen und lithoautotrophen Wachstumsbedingungen distinkte Genregulation erfasst werden. Weiterhin konnte durch den Einsatz mit Druck beaufschlagbarer, bioelektrochemischer Fließzellen die Dicke eines kathodischen *K. spormannii*-Biofilms erheblich gesteigert werden. Die geringe Ausprägung konventioneller, kathodischer Biofilme stellt derzeit eine der größten Limitationen bei der Weiterentwicklung der mikrobiellen Elektrosynthese dar. Abschließend konnte demonstriert werden, dass die physiologischen Eigenschaften des thermoacidophilen Knallgasbakteriums eine direkte Nutzung eines realen CO₂-Abgastromes durch *K. spormannii* ermöglichen. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Ergebnisse dieser Arbeit eine Eignung von *K. spormannii* als potenziellen Biokatalysator in einem zukünftigen, biotechnologischen Prozess zur stofflichen Nutzung von Kohlenstoffdioxid belegen. Im Folgenden sollen diese Ergebnisse diskutiert und ein abschließender Ausblick über zukünftige Forschungsfragen zur biotechnologischen Nutzung von *K. spormannii* gegeben werden.

4.1 Initiales Screening der Knallgas-Isolate

Zu Beginn dieser Arbeit wurden die zuvor von einer kathodischen Community angereicherten Knallgasbakterien, *Pseudomonas* sp. und *Hydrogenophaga* sp., in Reinkultur gebracht. Die Reinheit der Isolate wurde durch deren einheitliche mikro- und makroskopische Morphologie, sowie durch die molekularbiologische Methode der 16S-rDNA-Amplifikation bestätigt. So konnte keine Basenambiguität in den distinkten Peaks der Elektropherogramme der sequenzierten 16S-rDNA-Amplifikate festgestellt werden, welche jedoch bei einer Mischkultur zu erwarten wären. Trotz der ähnlichen physiologischen Eigenschaften der beiden Knallgas-Isolate, unterschieden sich *Hydrogenophaga* sp. und *Pseudomonas* sp. deutlich in ihrer makro- und mikroskopischen Morphologie. Vor allem das *Hydrogenophaga*-Isolat besticht durch eine intensiv gelbe Färbung, welche vermutlich auf

die Synthese und Einlagerung von Carotinoiden zurückzuführen ist (Willems *et al.*, 1989). Der hohe industrielle Bedarf an Carotinoiden, insbesondere als Nahrungs- und Futtermittelzusatz, resultiert in einem großen Interesse an neuen biotechnologischen Syntheserouten zur Produktion dieser Isoprenoide (Rodriguez-Concepcion *et al.*, 2018). Die Provenienz der Isolate aus einem kathodischen Biofilm deckt sich mit anderen Studien, in denen Spezies der Gattungen *Hydrogenophaga* und *Pseudomonas* auf den Kathoden bioelektrochemischer Systeme nachgewiesen werden konnten, obgleich zu diesem Zeitpunkt keine elektroautotrophen Organismen der Gattungen *Hydrogenophaga* oder *Pseudomonas* in der Literatur beschrieben wurden (Liu *et al.*, 2017; Revelo Romo *et al.*, 2019; Tian *et al.*, 2019). Darüber hinaus konnte in anderen Arbeiten eine Stromproduktion durch die anodische Interaktion von *Hydrogenophaga*, bzw. *Pseudomonas*-Reinkulturen in bioelektrochemischen Systemen nachgewiesen werden (Bosire & Rosenbaum, 2017; Kimura & Okabe, 2013; Rabaey *et al.*, 2005). Die Gattung *Kyrpidia* wurde in der Literatur bisher nicht mit bioelektrochemischen Systemen in Verbindung gebracht. Dafür ausschlaggebend könnte die geringe Anzahl an Publikationen zu bioelektrochemischen Systemen unter extremophilen Bedingungen sein (Dopson *et al.*, 2016; Shrestha *et al.*, 2018).

Die in Reinkultur gebrachten Isolate wurden anschließend einem initialen „Elektroautotrophie“-*Screening* unterzogen. Dabei wurden zum einen der Stromverbrauch in einem bioelektrochemischen System und zum anderen die Biofilmquantität in Form der nachgewiesenen Proteinmenge pro Kathodenfläche als *Screening*-Kriterien gewählt. Beide mesophilen Knallgasisolate katalysierten keinen gesteigerten Stromverbrauch im Vergleich zur abiotischen Medienkontrolle (Abb. 9A,C). Auch anhand der vergleichenden Proteinbestimmung hydrolysierter Biomasse der unterschiedlichen Kathoden konnte kein Unterschied in der Biofilmquantität detektiert werden (Abb. 10). Daraus lässt sich schließen, dass die beiden Isolate unter den gewählten Bedingungen nicht zur kathodischen Elektronenaufnahme in Reinkultur befähigt sind. In den taxonomischen Analysen der vorangegangenen Masterarbeit wurden die Gattungen *Hydrogenophaga* und *Pseudomonas* in der Community des kathodischen Biofilms der initialen Anreicherung identifiziert. Dies lässt darauf schließen, dass in dieser Community entweder (a) den beiden Isolaten die Rolle sekundärer heterotropher Kohlenstoffverwerter zuteil kam oder dass (b) eine indirekte Elektronenaufnahme der beiden Spezies von der Sekretion endogener Elektronenshuttles oder auch elektroaktiver Enzyme (z.B. Hydrogenasen) durch andere elektroautotrophe Organismen abhängig war.

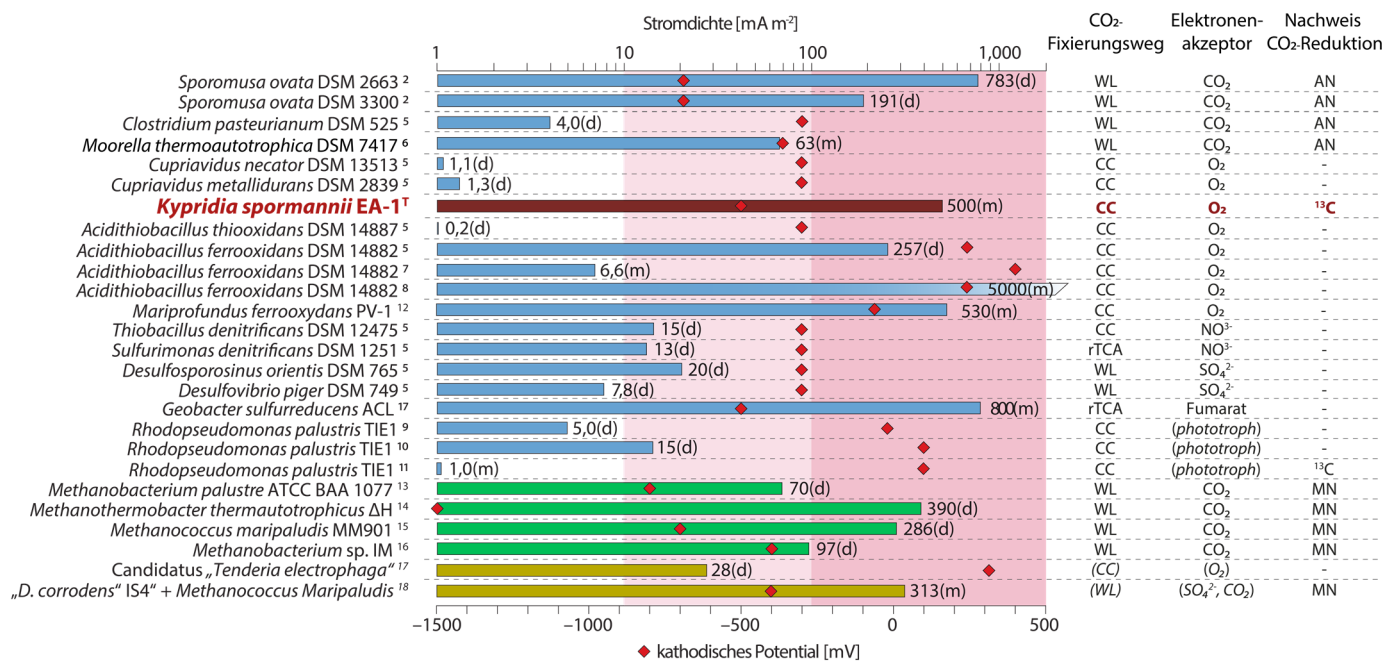


Abb. 29: Einordnung von *K. spormannii* in die Übersicht über den kathodischen Stromverbrauch verschiedener autotropher Organismen, die verwendeten CO₂-Fixierungswege und Elektronenakzeptoren sowie erbrachte CO₂-Fixierungsnachweise. Erweitert und verändert nach Logan (Logan et al., 2019). In Abb. 5 aufgeführte Organismen, deren Kultivierung in hefeextrakt-haltigem Medium durchgeführt wurde, sind aus dieser Auflistung zur besseren Übersicht entfernt worden. Die Balkenlänge entspricht der durchschnittlichen (d) oder maximalen (m) Stromdichte. Das kathodische Potential wird durch die Position der roten Raute angegeben. Blaue Balken sind Bacteria zugehörig, grüne Balken wurden für Archaea gewählt. Bei gelben Balken handelt es sich nicht um eine Reinkultur. k.A – keine Angabe; WL – Wood-Ljungdahl-Weg; CC – Calvinzyklus; rTCA – reduktiver Citratzyklus; AN – Acetatnachweis; MN – Methannachweis; ¹³C – Nachweis der CO₂-Fixierung durch Isotopenanalysen. ¹ - (Zhang et al., 2013); ² - (Aryal, Tremblay, et al., 2017); ³ - (Nevin et al., 2011); ⁴ - (Bajracharya et al., 2015); ⁵ - (de Campos Rodrigues & Rosenbaum, 2014); ⁶ - (Yu et al., 2017); ⁷ - (Ishii et al., 2015); ⁸ - (Carbajosa et al., 2010); ⁹ - (Doud & Angenent, 2014); ¹⁰ - (Bose et al., 2014); ¹¹ - (Guzman et al., 2019); ¹² - (Summers et al., 2013); ¹³ - (Cheng et al., 2009); ¹⁴ - (Sato et al., 2013); ¹⁵ - (Lohner et al., 2014); ¹⁶ - (Beese-Vasbender, Grote, et al., 2015); ¹⁷ - (Deutzmann & Spormann, 2017); ¹⁸ - (Wang et al., 2015).

Kyripidia spormannii hingegen katalysierte einen deutlichen Stromverbrauch während der chronoamperometrischen Kultivierung im bioelektrochemischen System. Die Einordnung der durch *K. spormannii* erreichten Stromdichten in die zu Beginn dieser Arbeit gezeigte Übersichtstabelle über den kathodischen Stromverbrauch verschiedener elektroaktiver Mikroorganismen zeigt, dass die gemessene reduktive Stromstärke von -500 mA m^{-2} vergleichbar oder gar höher als die in der Literatur beschriebenen Stromdichten anderer Spezies ausfällt. Dabei sollte jedoch erwähnt werden, dass die Vergleichbarkeit der in den aufgeführten Studien gemessenen Stromdichten durch die Verwendung unterschiedlicher Kathodenmaterialien, Reaktoraufbauten und Betriebsbedingungen (Temperatur, pH, Salzkonzentration des Elektrolyt) beeinträchtigt werden kann (Logan et al., 2019). Abb. 29 zeigt, dass lediglich die Spezies *Sporomusa ovata*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Mariprofundus ferrooxidans* und *Geobacter sulfurreducens* höhere kathodische Stromdichten in einem bioelektrochemischen System katalysieren können. Allerdings wurde die aufgeführte Stromdichte von *S. ovata* bei einem Potential von -700 mV . vs. SHE erreicht (vgl. -500 mV vs. SHE bei *K. spormannii* in dieser Arbeit). In einer weiteren Studie zu *S. ovata*

konnte hingegen nur eine Stromdichte von -207 mA m^{-2} bei einem Potential von -400 mV vs. SHE gemessen werden (Nevin *et al.*, 2010). Trotz der erreichten Stromdichten von -800 mA m^{-2} kann der aufgeführte *Geobacter*-Stamm als ein eher ungeeigneter Biokatalysator für einen mikrobiellen Elektrosyntheseprozess angesehen werden. Dies kann zum einen auf den fehlenden Nachweis der kathodischen CO_2 -Reduktion und zum anderen auf die an eine Fumaratreduktion gekoppelte Elektronenaufnahme zurückgeführt werden.

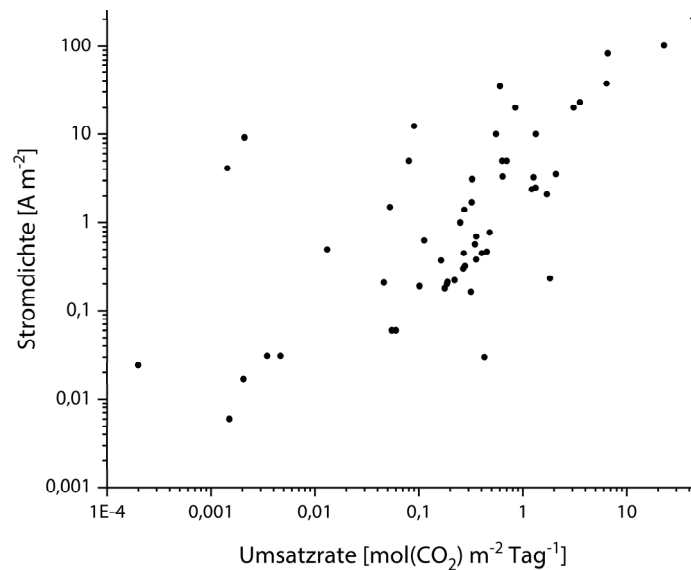


Abb. 30: Doppeltlogarithmischer Auftrag der Umsatzrate acetatproduzierender, anoxischer Elektrosynthesysteme gegen die dabei erreichten Stromdichten. Die Daten wurden einer tabellarischen Übersicht aus Aryal *et al.* entnommen (Aryal, Ammam, *et al.*, 2017).

In anoxischen, mikrobiellen Elektrosynthesystemen scheint eine hohe Stromdichte meist an eine hohe Umsatzrate gekoppelt zu sein (Siehe Abb. 30). Allerdings kann in oxischen Systemen, wie zum Beispiel bei den Arbeiten zu *A. ferrooxidans* und *M. ferrooxydans* (sic), ein vermutlich großer Teil des gemessenen, kathodischen Stromverbrauches einer abiotischen Sauerstoffreduktionsreaktion an der Kathode zugesprochen werden (Freguia *et al.*, 2007; Rabaey *et al.*, 2008; Renslow *et al.*, 2011). Hiermit könnten auch die teilweise extremen Unterschiede in der gemessenen Stromdichte der in Abb. 29 aufgeführten, aeroben Organismen erklärt werden. So schwanken die in der Literatur für *A. ferrooxidans* beschriebenen Stromstärken (bei ähnlichem kathodischem Potential) zwischen 6 und 5000 mA m^{-2} . Darüber hinaus stehen die hohen Werte dieser in der Literatur gemessenen Stromstärken im Kontrast zu den gezeigten, mikroskopischen Aufnahmen der eher spärlich durch *M. ferrooxydans* oder *A. ferrooxydans* besiedelten Kathoden (Carbajosa *et al.*, 2010; Ishii *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2019; Summers *et al.*, 2013). Da sich die Stromdichte somit nicht als alleiniges Kriterium zur Evaluation aerober, potenziell elektroautotropher Organismen eignet, handelt es sich bei der - im Rahmen des Screenings zusätzlich

bestimmten - Biomasse der kathodischen Biofilme um ein wichtiges Kontrollkriterium. In der Literatur sind hierzu jedoch keine Vergleichsdaten zu finden, da sich die meisten Arbeiten rein auf den Stromverbrauch und die Morphologie der kathodischen Biofilme konzentrieren.

Während die Stromdichte der beiden mesophilen Isolate über den gesamten Potentialbereich der durchgeführten linearen Voltammetrie nur von geringen Änderungen geprägt ist, steigt die Stromdichte in einem mit *K. spormannii* inokulierten Elektrosynthesereaktor mit zunehmendem negativen Potential deutlich an (Abb. 9B,D,F). Darüber hinaus lässt sich ab einem Potential von ca. -400 mV vs. SHE eine steilere negative Steigung der linearen Zunahme der reduktiven Stromdichte erkennen (siehe Abb. 9F). Dabei könnte es sich um den biotischen Effekt einer direkten Elektronenaufnahme oder aber auch um eine ab diesem Potential eintretende abiotische oder auch biotische (spezifisch oder unspezifisch katalysierte) Wasserstoffentstehung handeln. Angesichts dessen, dass es sich bei der kathodischen Wasserstoffentstehung um eine protonenabhängige Reaktion handelt, kann diese – aus thermodynamischer Sicht - unter den für *K. spormannii* gewählten Bedingungen (60 °C, pH 3,5) bereits bei höheren kathodischen Potentialen auftreten (-231 mV vs. SHE) als unter mesophilen und neutralen Bedingungen, wie sie für *Hydrogenophaga* und *Pseudomonas* gewählt wurden (-421 mV vs. SHE).

4.2 Artbeschreibung *Kyrpidia spormannii* EA-1^T

Der duale Sequenzierungsansatz resultierte in der erfolgreichen Assemblierung des geschlossenen Genoms von *K. spormannii*. Dabei konnte mit einem QV-Wert von 60 eine äußerst geringe Fehlerrate erreicht werden. Die Genomgröße konnte auf 3,35 Mbp festgesetzt werden und liegt damit im Bereich der durchschnittlichen Größe bakterieller Genome (Burke & Moran, 2011). Der GC-Gehalt des einzelnen Chromosoms beträgt 58,71 % und liegt damit über dem durchschnittlichen, bakteriellen GC-Gehalt von 48,8 % (Almpanis *et al.*, 2018). Vergleicht man den GC-Gehalt des assemblierten Genoms mit dem GC-Gehalt der zum *Kyrpidia*-Isolat am nächsten verwandten Typstämme, ergibt sich eine positive Korrelation zwischen erhöhtem GC-Gehalt und thermophiler Lebensweise (siehe Abb. 31). Obwohl dieser Zusammenhang für ein Großteil der bakteriellen Familien gezeigt werden konnte, steht der Einfluss der optimalen Wachstumstemperatur auf den GC-Gehalt bakterieller Genome unter großer wissenschaftlicher Debatte (Almpanis *et al.*, 2018; Musto *et al.*, 2006).

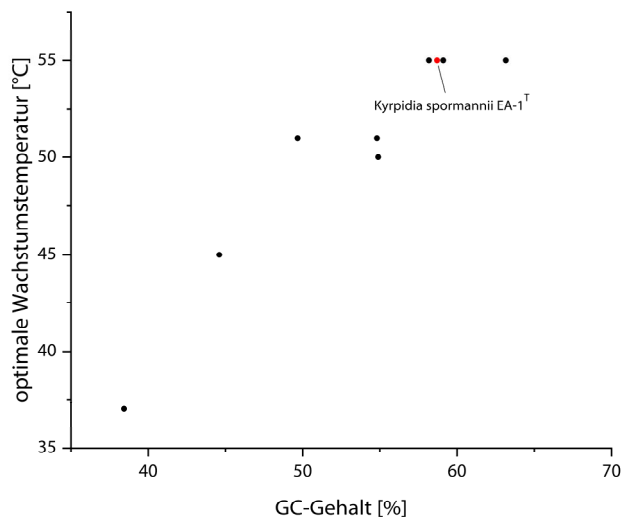


Abb. 31: Übersicht über den Zusammenhang zwischen genomischem GC-Gehalts und optimaler Wachstumstemperatur der in Abbildung 13 aufgeführten Typstämme.

Die nach der Genomsequenzierung durchgeführte Stammcharakterisierung zur Artabgrenzung von *K. tusciae* belegt eindeutig, dass es sich bei *K. spormannii* um eine eigenständige Art der Gattung *Kyrpidia* handelt. Obwohl sich die beiden Arten auf physiologischer und chemotaxonomischer Ebene in gewissem Maße ähneln, konnten evidente Unterschiede identifiziert werden, welche zur Artabgrenzung zwischen den beiden Spezies herangezogen werden können. In beiden Spezies konnte lediglich

Menachinon 7 (MK-7) als einziges respiratorisches Chinon konstatiert werden. Dies unterstützt die Zugehörigkeit des *Kyrpidia*-Isolates in die Familie der Alicyclobacillaceae, da in der Literatur MK-7 als das dominante respiratorische Chinon aller Mitglieder dieser Familie beschrieben wird (De Vos *et al.*, 2009). Dennoch konnten in beiden Spezies keine eponymen alizyklischen Fettsäuren nachgewiesen werden. Die erstellten Fettsäureprofile wiesen keine qualitativen Unterschiede bezüglich der Zusammensetzung der häufigsten Fettsäuren auf: Iso-C_{16:0}, anteiso-C_{17:0} und iso-C_{17:0} trugen zu mehr als 80 % der gesamten Fettsäuren bei. Bei der in *K. spormannii* am häufigsten auftretende Fettsäure handelte es sich um iso-C_{17:0}. In *K. tusciae* konnte hingegen iso-C_{16:0} als dominanteste Fettsäure bestimmt werden. Letzteres Ergebnis unterscheidet sich deutlich von den Literaturangaben zum Fettsäureprofil von *K. tusciae* (Klenk *et al.*, 2011). Dies kann jedoch auf den großen Einfluss von Kultivierungsdauer und -bedingungen auf die Zusammensetzung der bakteriellen Fettsäureprofile zurückgeführt werden (Kankaanpää *et al.*, 2004; O'leary, 1962). Aus diesem Grund wurden die Profile beider Stämme unter gleichen Bedingungen bestimmt. Ein weiterer Unterschied konnte bezüglich des Ergebnisses des Oxidase-Tests festgestellt werden. *K. spormannii* ist deutlich oxidase-positiv, wohingegen *K. tusciae* als lediglich schwach oxidase-positiv beschrieben wurde (Bonjour & Aragno, 1984). Ob es sich dabei um Auswirkungen der im Genom von *K. spormannii* gefundenen zusätzlichen Atmungskettenbestandteile handelt, bleibt an dieser Stelle ungeklärt. Die Kohlenstoffverwertungsprofile der beiden Stämme können ebenfalls zur Artunterscheidung herangezogen werden. Bonjour und Aragno konnten keine Verwertung von Zuckern, Pyruvat und Acetat durch *K. tusciae* detektieren (Bonjour & Aragno, 1984). Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen der in dieser Arbeit durchgeführten *Biolog*-Analyse. Im Gegensatz dazu konnte *K. spormannii* Pyruvat,

Acetat sowie einige Zucker als alleinige Kohlenstoffquelle nutzen. Da nur geringe Unterschiede im zentralen Kohlenstoffmetabolismus der beiden Spezies detektiert wurden, kann dieser physiologische Unterschied vermutlich auf die im Genom von *K. spormannii* gefundenen zusätzlichen Substrattransporter zurückgeführt werden. Im Einklang mit der durch Bonjour und Aragno beschriebenen Nitratreduktion konnten die Gene eines Nitrat-/Nitrit-Transporters (*nrt*) sowie die genetische Information zur Nitrat-, bzw. Nitritreduktion (*narHJl*, *nirBD*, *nasAB*) ausschließlich im Genom von *K. tusciae* gefunden werden. Im Genom von *K. spormannii* konnte hingegen ein Nitrogenase-Gencluster identifiziert werden, obwohl keine experimentellen Hinweise auf eine Stickstofffixierung durch *K. spormannii* in einer heterotrophen Flüssigkultur erlangt werden konnten. Aufgrund der hohen Sauerstoffsensitivität typischer Nitrogenasen wird sowohl die Transkription als auch die Enzymaktivität derselbigen durch die Anwesenheit von Sauerstoff gehemmt (Gallon, 1981). Dies konnte ebenfalls durch die Transkriptomanalyse bestätigt werden, da keine Expression des Nitrogenaseclusters unter heterotrophen und lithoautotrophen Bedingungen detektiert werden konnte. Interessanterweise zeigte sich jedoch unter elektroautotrophen Bedingungen eine geringe Expression der Nitrogenasegene. Dies könnte auf die vermutlich geringere Sauerstoffkonzentration im Biofilm zurückgeführt werden. So wurden an anderer Stelle Aerobier beschrieben, welche die intrazelluläre Sauerstoffkonzentration durch das Ausbilden einer biofilmähnlichen „Schleimkapsel“ zur Expression einer funktionellen Nitrogenase geringhalten (Roy, 1958; Wang *et al.*, 2017).

4.3 Untersuchungen zum EET-Mechanismus von einer Kathode in *K. spormannii*

Anhand der in dieser Arbeit erfassten Transkriptomdaten wurde ein Modell der verzweigten Atmungskette von *K. spormannii* aufgestellt. Dabei wurden zwei homologe Gencluster ermittelt, welche für zwei (Typ I) NADH-Dehydrogenase-Komplexe (Nuo-Komplexe) codieren (Berrisford *et al.*, 2016). Nach dem entwickelten Atmungskettenmodell (Abb. 20) besitzt ein Nuo-Komplex eine anabole, der andere hingegen eine katabole, reverse Funktion. Interessanterweise konnten die Gene *nuoE-G* nicht in den *nuo*-Clustern im Genom von *K. spormannii* gefunden werden. Diesen Nuo-Untereinheiten wird die Funktion der NAD(H)-Bindedomäne zugesprochen, sodass die Hypothese eines alternativen Substrates der gefundenen Nuo-Komplexe aufgestellt wurde. Als ein mögliches Substrat wurde Ferredoxin identifiziert. Dessen Sauerstoffsensitivität könnte für das Wachstumshemmnis, welches bei starkem Schütteln heterotropher *K. spormannii* Kulturen auftrat, mitverantwortlich gemacht werden. Diese Sauerstoffsensitivität steht der Klassifizierung

von *K. spormannii* als obligat aerobes Knallgasbakterium gegenüber. So konnten vor allem in den Transkriptomdaten der elektroautotrophen Kultivierung mehrere Hinweise auf eine potenzielle Sauerstofflimitation im kathodischen Biofilm gefunden werden. Die hohe Expression der Menachinoloxidasen könnte als ein Indiz dafür gewertet werden. Die aus thermodynamischer Sicht ineffizientere Nutzung der zur Energiekonservierung verfügbaren Redoxpotentialdifferenz resultiert bei einer direkten Sauerstoffreduktion durch Menachinoloxidasen (geringeres ΔH^+) - verglichen mit der Sauerstoffreduktion über den klassischen Cytochrom-*c*-Reduktase/Oxidase-Weg (höheres ΔH^+) - in einer geringeren Reversibilität der terminalen Sauerstoffreduktion. Daher zeigen Menachinoloxidasen typischerweise eine höhere Sauerstoffaffinität als Cytochrom-*c*-Oxidasen. Allerdings beeinflussen neben dem genannten *rate/yield-tradeoff* auch weitere Faktoren, wie diverse Nährstofflimitationen oder Zellstress durch Sauerstoffradikale, die Expression von Menachinoloxidasen zur direkten Sauerstoffreduktion (Borisov *et al.*, 2011). Als ein weiterer Hinweis zur Sauerstofflimitierung unter elektroautotrophen Bedingungen kann die hohe Expression des (nicht-häm) Di-Eisen-Proteins Hämyerythrin gewertet werden. In Bakterien konnte die genaue Funktion dieses sauerstoffbindenden Proteins noch nicht abschließend geklärt werden. Allerdings wurde in anderen Arbeiten eine bakterielle Expression unter sauerstofflimitierenden Bedingungen beschrieben (Kurtz, 2004; Li *et al.*, 2015; Overton *et al.*, 2008). Eine Beteiligung von Hämyerythrin an einem unbekanntem EET-Mechanismus scheint zwar aufgrund der geringen absoluten Expression als recht unwahrscheinlich, kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Ein direkter extrazellulärer Elektronentransfer (EET) wird in den meisten Mikroorganismen durch multihäm *c*-Typ Cytochrome vermittelt. Im Rahmen der Transkriptomanalyse konnten keine Anhaltspunkte für einen cytochromvermittelten EET von einer Kathode gefunden werden. Bei *K. spormannii* handelt es sich um einen Gram-positiven Organismus. Solch eine direkte Elektronentransportroute scheint jedoch ausschließlich von Gram-negativen Mikroorganismen zum EET genutzt zu werden. Lediglich eine Ausnahme ist in der Literatur beschrieben worden; so sind im Gram-positiven Organismus *Thermincola potens* ebenfalls multihäm *c*-Typ Cytochrome am EET auf einen unlöslichen Elektronenakzeptor beteiligt (Carlson *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2019). Ferner konnten keine Hinweise auf einen flavoproteinbasierten EET erbracht werden, wie er z.B. für das Gram-positive Bakterium *Listeria monocytogenes* beschrieben wurde (Light *et al.*, 2018). Zusammenfassend kann also ein direkter EET nach derzeit bekannten Mechanismen ausgeschlossen werden. Die starke Expression beider [NiFe]-Hydrogenase-Untereinheiten unter elektroautotrophen Bedingungen deutet hingegen eher auf eine Hydrogenase-vermittelte

Elektronenaufnahme durch *K. spormannii* hin. Anhand der mit beiden Untereinheiten der [NiFe]-Hydrogenase durchgeführten BLASTP-Analyse konnte eine nur geringe Sequenzähnlichkeit zur Hydrogenase des nächsten Verwandten *K. tusciae* festgestellt werden (siehe Appendix auf Seite 142). Die kleine, elektronentransferierende Untereinheit der [NiFe]-Hydrogenase weist interessanterweise die höchste Sequenzähnlichkeit zur Hydrogenase aus *Acidithiobacillus ferrooxidans* auf. Dieser ebenfalls acidophile, aerobe Eisenoxidierer ist zur kathodischen Elektronenaufnahme bei einem Potential von 0 mV vs. SHE befähigt. Aufgrund des vergleichsweise hohen Redoxpotentials wurde ein direkter EET für die kathodische Elektronenaufnahme durch *A. ferrooxidans* postuliert (Carbajosa *et al.*, 2010; Ishii *et al.*, 2015). Ob es sich beim Hydrogenase-vermittelten EET durch *K. spormannii* um einen direkten oder indirekten Prozess handelt, kann anhand der Transkriptomdaten allein nicht geklärt werden. Abb. 32 fasst drei mögliche Elektronenaufnahmerouten unter Beteiligung der [NiFe]-Hydrogenase zusammen. Eine Nutzung von abiotisch (I) oder durch diese Hydrogenase enzymatisch (II) an der Kathode produziertem Wasserstoff als Elektronenshuttle ist auf Grund des gewählten Redoxpotentials von -500 mV vs. SHE aus thermodynamischer Sicht möglich. Darüber hinaus könnte die gefundene Hydrogenase auch eine direkte Elektronenaufnahme katalysieren, wie häufig in der Literatur postuliert (III) (Rosenbaum *et al.*, 2011; Sydow *et al.*, 2014). Aufgrund der dicken Peptidoglycanschicht Gram-positiver Mikroorganismen, kann ein direkter, physischer Kontakt der membranverankerten Hydrogenase mit der Kathode als recht unwahrscheinlich eingestuft werden (Vollmer & Seligman, 2010).

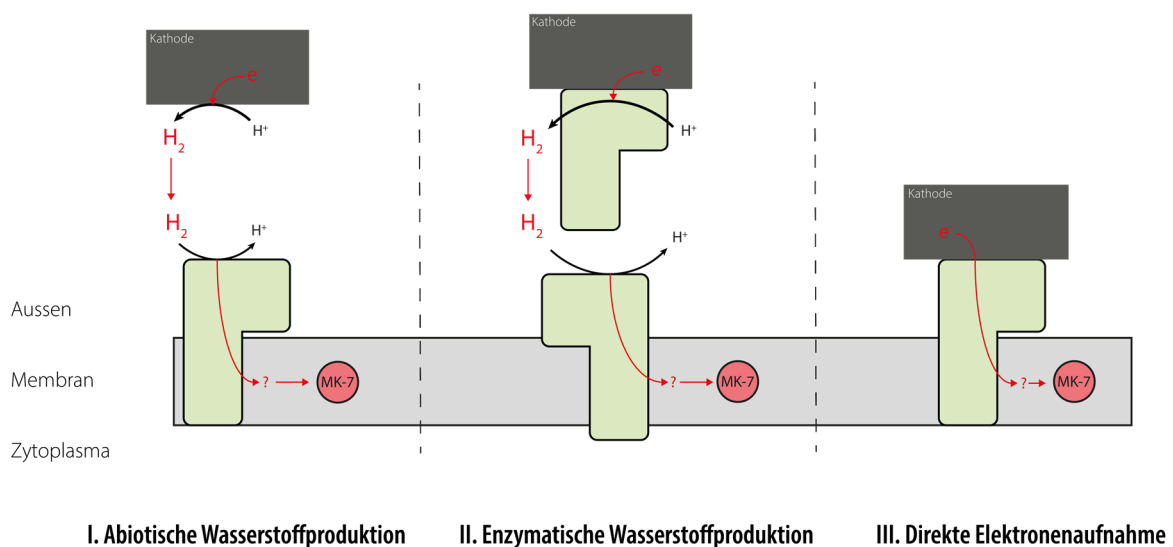


Abb. 32: Schematische Darstellung möglicher Elektronenaufnahmerouten unter Beteiligung der [NiFe]-Hydrogenase aus *K. spormannii*.

Im Falle eines indirekten Hydrogenase-medierten EETs könnte der Abfall der Stromstärke des inokulierten bioelektrochemischen Systems (Abb. 9E) durch eine konzentrationsbedingte Änderung des Redoxpotentials der Wasserstoffentstehungsreaktion verursacht werden. In Tab. 42 ist die Änderung des Redoxpotentials der Wasserstoffentstehung in Abhängigkeit zum Wasserstoffpartialdruck angegeben. In syntrophen mikrobiellen Communitys ist eine Limitierung des Wasserstoffpartialdrucks durch die Aktivität hydrogenotropher Organismen auf bis zu 10^{-5} atm beschrieben (Lee & Zinder, 1988). Während der Kultivierung im bioelektrochemischen System könnte die in der linearen Voltrammetrie beobachtete mutmaßliche Wasserstoffentstehung bei einem Potential von -500 mV für ein initiales Wachstum eines kathodischen Biofilms sorgen. Anschließend sorgt der biotische Wasserstoffverbrauch für einen geringen Wasserstoffpartialdruck an der Kathode. Die Folge wären steigende Wasserstoffproduktionsraten und somit steigende Stromdichten aufgrund des höheren Redoxpotentials der Wasserstoffentstehungsreaktion.

Tab. 42: Abhängigkeit des Redoxpotentials der Wasserstoffentstehungsreaktion vom Wasserstoffpartialdruck unter den für *K. spormannii* gewählten Bedingungen.

Redoxpotential der Wasserstoffentstehungsreaktion bei pH 3,5 und 60 °C

<i>Wasserstoffpartialdruck [atm]</i>	<i>E (H₂/H⁺) [mV]</i>
10 ¹	-231
10 ⁻¹	-198
10 ⁻²	-165
10 ⁻³	-132
10 ⁻⁴	-99
10 ⁻⁵	-66

Um zu überprüfen, ob es sich bei der kathodischen Wasserstoffentstehung um eine enzymatisch katalysierte Reaktion handelt, wurde ein Eisenkorrosionsexperiment nach Deutzmann durchgeführt (siehe Kapitel 3.7). Interessanterweise konnte bereits in der Negativkontrolle (steriles ES-Medium + Eisengranula) eine signifikante Wasserstoffentwicklung in der Gasphase der Kulturflaschen gemessen werden. Durch die Inokulation mit unbehandeltem oder autoklaviertem Zellüberstand autotroph gewachsener *K. spormannii*-Kulturen wurden keine höheren Wasserstoffproduktionsraten erzielt. Somit konnte eine durch freie Hydrogenasen vermittelte Katalyse als primäre Quelle der Wasserstoffentstehung ausgeschlossen werden. Anhand dieses Experiments konnte

gezeigt werden, dass unter gewählten Bedingungen (pH 3,5; 60 °C, ES-Medium) eine abiotische Wasserstoffproduktion an einem unlöslichen Elektronendonator bereits ab einem Potential von -440 mV vs. SHE möglich ist. Ohne Berücksichtigung der unbekanntes Überpotentiale an der verwendeten Graphitkathode kann dies als ein weiterer Hinweis auf die initiale, abiotische Wasserstoffentstehung im bioelektrochemischen System gewertet werden. Dass es sich bei dem gemessenen Wasserstoff um Rückstände des Wasserstoffs aus der Gasphase der Vorkulturen handeln könnte, kann anhand des in der oben genannten Negativkontrolle gemessenen Wasserstoffs ausgeschlossen werden. Dieses sterile Medium wurde zuvor lediglich mit N₂/CO₂ anaerobisiert und kann somit keine Wasserstoffverunreinigungen enthalten. Dennoch konnte in der Gasphase die gleiche Menge Wasserstoff wie in der Gasphase der anderen Proben detektiert werden.

Der fehlende Nachweis einer enzymbasierten Wasserstoffentstehung könnte auf zwei unterschiedliche Gründe zurückgeführt werden. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass ein biotischer Effekt durch die Überlagerung mit der abiotischen Wasserstoffentstehung gar nicht erst detektiert werden konnte. So betrug die enzymkatalysierte Wasserstoffproduktion durch Zellüberstand von *M. maripaludis* – dem „Modellorganismus“ für enzymbasierte Wasserstoffproduktion – lediglich ein Drittel der gemessenen, abiotischen Wasserstoffproduktion in ES-Medium. Ein weiterer Grund könnte im Unterschied der [NiFe]-Hydrogenase aus *K. spormannii* zu den Hydrogenasekomplexen acetogener und methanogener Organismen gefunden werden. So wurde eine Hydrogenase-katalysierte Wasserstoffentstehung bisher nur als EET-Mechanismus von Methanogenen und Acetogenen beschrieben. Die Hydrogenasen dieser physiologischen Gruppen sind meist Teil eines größeren respiratorischen Komplexes, wie zum Beispiel dem Heterodisulfidreduktase-, Rnf- oder Ech-Komplex (siehe Kapitel 1.3.1.2). Während die Elektronenaufnahme von einer Kathode durch einen aufgereinigten Heterodisulfidreduktase-Komplex bereits nachgewiesen werden konnte, wurde er für die anderen beiden Komplexe ebenfalls postuliert. Die genauen, molekularen Elektronenaufnahmemechanismen dieser Komplexe sind derzeit jedoch nicht bekannt. Eine Involvierung von Disulfidbrücken in der kathodischen Elektronenaufnahme scheint indes wahrscheinlich (Lienemann *et al.*, 2018).

Darüber hinaus ließ sich kein Unterschied in der Wasserstoffentwicklung zwischen den verschiedenen mit *K. spormannii* und den verschiedenen mit *K. tusciae* inokulierten Ansätzen detektieren. Dies erscheint insbesondere vor dem Hintergrund der unterschiedlichen Stromdichten beider Isolate im bioelektrochemischen System

bemerkenswert. Bei gleichen Bedingungen (ES-Medium; pH 3,5; 60 °C) katalysiert *K. tusciae* eine deutlich geringere Stromstärke im bioelektrochemischen System (submitted Manuskript, Reiner et al., 2019, siehe Appendix). Mehrere Gründe könnten hierfür in Betracht gezogen werden: Zum einen könnten die im Genom von *K. spormannii* gefundenen, zusätzlichen Menaquinoloxidasen einen Wachstumsvorteil bei einer Sauerstofflimitierung oder der Präsenz von Sauerstoffradikalen mit sich bringen. Diese können aufgrund des Einkammeraufbaus der verwendeten bioelektrochemischen Systeme entweder an der Anode oder auch an der Kathode durch unvollständige Redoxreaktionen entstehen. Zum anderen könnten weitere unbekannte Detoxifikationsmechanismen zur Eliminierung von Radikalen *Kyrpidia spormannii* einen Wachstumsvorteil unter elektroautotrophen Bedingungen verschaffen. Darüber hinaus könnte die Verwendung eines zweiten unbekanntem Elektronenaufnahmeweges (neben der Nutzung des kathodisch generierten Wasserstoffes) für den gemessenen Unterschied in der Stromdichte beider Spezies verantwortlich sein. Da sich die beiden Organismen in ihrem lithoautotrophen Wachstum kaum unterscheiden und ähnliche Wachstumsgeschwindigkeiten und Zelldichten erreichen, kann eine höhere Wasserstoffaffinität oder eine größere Sauerstofftoleranz der [NiFe]-Hydrogenase aus *K. spormannii* verglichen mit der [NiFe]-Hydrogenase aus *K. tusciae* eher ausgeschlossen werden.

Das Modell der Atmungskette konnte in den Versuchen zur Inhibition derselbigen unter elektroautotrophen Bedingungen bestätigt werden. Bei den verwendeten Atmungsketteninhibitoren handelte es sich um Rotenon, Antimycin A und CCCP. Lediglich durch die Zugabe von CCCP konnte ein Effekt auf die reduktive Stromdichte erwirkt werden. Bei näherer Betrachtung der unterschiedlichen Wirkungsweise dieser Inhibitoren kann das Ergebnis schlüssig interpretiert werden. Rotenon blockiert die Elektronenabgabe des Atmungskettenkomplexes I (Nuo-Komplex) in den Menachinonpool. Da die Zugabe von Rotenon keinen Einfluss auf die Stromdichte des bioelektrochemischen Systems erkennen ließ, kann darauf geschlossen werden, dass die vermutlich durch die [NiFe]-Hydrogenase aufgenommenen Elektronen „direkt“ in den Menaquinolpool eingespeist werden und nicht in Form von Reduktionsäquivalenten, wie zum Beispiel NAD(P)/H oder Ferredoxin, zwischengespeichert und anschließend über Komplex I in die Atmungskette eingeschleust werden. Aufgrund der vermutlich verzweigten Atmungskette von *K. spormannii*, konnte ebenfalls kein Effekt nach der Zugabe von Antimycin A gemessen werden. Dieser Atmungsketteninhibitor wird aus Streptomyceten gewonnen und inhibiert den Elektronenübertrag aus dem Menachinonpool auf den Cytochrom-c-Reduktasekomplex (Komplex III). Da Sauerstoff in *K. spormannii* auch direkt aus dem Menachinonpool mit Hilfe

der zuvor genannten (unter elektroautotrophen Bedingungen hochregulierten) Menaquinoloxidasen reduziert werden kann und diese keine oder nur eine geringe Antimycin-Sensitivität aufweisen, kann dem Effekt einer Blockade der Cytochrom-c-Oxidase/Reduktaseroute nur geringe Auswirkungen zugesprochen werden (Sugio *et al.*, 2006). Die Wirkung des zuletzt eingesetzten Inhibitors CCCP beruht auf dessen Eigenschaft als Protonophor. So wird die bakterielle Membran durch den Einbau von CCCP durchlässig für Protonen, sodass ein Protonengradient zur ATP-Synthese nicht mehr oder nur erschwert aufgebaut werden kann. Hierdurch werden sämtliche zellulären Stoffwechselfvorgänge und respiratorische Prozesse zum Erliegen gebracht. Der Abfall der reduktiven Stromdichten des bioelektrochemischen Systems nach der Zugabe von CCCP, verdeutlicht somit den auch im initialen Screening beobachteten biotischen Anteil am kathodischen Elektronenverbrauch.

4.4 Evaluation von PHB als potenzielles Produkt eines mikrobiellen Elektrosyntheseprozesses

Bei *Kyrpidia spormannii* handelt es sich – wie bei den meisten Knallgasbakterien – um einen natürlichen PHB-Produzenten. Polyhydroxybutyrat dient dabei unter nicht stöchiometrischen Wachstumsbedingungen, wie zum Beispiel einer Limitierung der Stickstoffquelle oder des Elektronenakzeptors, als ein intrazellulärer Kohlenstoff- und Elektronenspeicher (Castro-Sowinski *et al.*, 2010; Mohidin Batcha *et al.*, 2014; Riedel *et al.*, 2012). Strukturell gesehen handelt es sich bei PHB um einen thermoplastischen Polyester, der in die Familie der Polyhydroxyalkanoate einzuordnen ist. In der Literatur werden PHB häufig ähnliche Eigenschaften wie Polypropylen zugeschrieben (Barham *et al.*, 1984; Du *et al.*, 2012). Jedoch unterscheiden sich PHAs von den meisten Kunststoffen auf Erdölbasis durch ihre vergleichsweise hohe biologische Abbaubarkeit. Die Limitierung der globalen, fossilen Rohstoffbestände sowie das wachsende Bewusstsein über die ökologischen und gesundheitlichen Folgen der Umweltverschmutzung durch Plastikmüll sorgt für eine steigende Nachfrage nach biologisch abbaubaren Polymeren aus nachhaltiger Rohstoffproduktion. Dahingehend erzielen Biokunststoffe deutlich höhere Wachstumsraten auf dem globalen Kunststoffmarkt als erdölbasierte Kunststoffe (Haddadi *et al.*, 2019). So handelt es sich bei PHAs, neben Polylactiden und den stärkebasierten Kunststoffen um die derzeit wichtigsten biologisch abbaubaren Biopolymere. Allerdings sind die Anwendungsmöglichkeiten von PHB aufgrund dessen physikalischer Eigenschaften derzeit noch begrenzt. So liegt zum Beispiel dessen Schmelztemperatur (T_m) nahe der thermischen Zersetzungstemperatur von reinem PHB. Des Weiteren handelt es sich bei

reinem PHB um einen hochkristallinen, steifen und somit leicht brüchigen Werkstoff. Durch chemische Modifikationen oder durch die Herstellung von Polymerblends mit anderen Biopolymeren oder nachwachsenden Rohstoffen, wie z.B. Lignin, Amylose oder Cellulose konnten die physikalischen Eigenschaften des Werkstoffs bereits deutlich verbessert werden und eröffnen so eine breitere Anwendung von PHB. Aufgrund seiner Biokompatibilität eignet sich PHB insbesondere für biomedizinische Anwendungen (Li *et al.*, 2016). Viele aktuelle Forschungsprojekte zielen auf die Optimierung der industriellen Eigenschaften von PHB (Dietrich *et al.*, 2017; Możejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016). Eine entsprechende Materialoptimierung wurde beispielsweise auch für PVC durchgeführt, ein heute weitverbreiteter erdölbasierter Kunststoff, dessen Rohverbindung ohne die Zusätze von Additiven oder einer chemischen Modifikation keine zufriedenstellenden, industriellen Eigenschaften aufweist (Hänggi, 2014). Die großtechnischen Produktionskosten von PHB sind derzeit vier- bis neunmal so hoch wie die der erdölbasierten Produktion von Polypropylen oder Polyethylen (Haddadi *et al.*, 2019; Roland-Holst, 2013). Bei der industriellen, biotechnologischen PHB-Synthese wird gegenwärtig, aufgrund der einfachen mikrobiellen Zugänglichkeit dieser Kohlenstoffquellen, überwiegend Glukose und Fruktose als Substrat eingesetzt (Koller *et al.*, 2012). Ein Großteil der hohen Produktionskosten von PHB wird durch diese Substratkosten verursacht. Daher besteht ein großes Interesse an der Suche nach alternativen Substraten zur mikrobiellen PHB-Synthese (Du *et al.*, 2012; Sen *et al.*, 2019). Neben organischem Abfallströmen zur heterotrophen PHB-Synthese kann PHB auch von autotrophen Organismen aus CO₂ aufgebaut werden. So konnte eine PHB-Ausbeute von über 80 % in der Zelltrockenmasse des lithoautotroph kultivierten Knallgasbakteriums *Cupriavidus necator* erzielt werden (Wasserstoff als Elektronendonator, Sauerstoff als Elektronenakzeptor) (Tanaka & Ishizaki, 1994; Tanaka *et al.*, 1995). Jedoch konnte dabei kein Zellwachstum detektiert werden. Allgemein kann die geringe Löslichkeit von Wasserstoff als einer der limitierenden Faktoren der lithoautotrophen PHB-Produktion angesehen werden, welche von nur geringen Wachstumsraten der Produktionsstämme charakterisiert ist. Die Berücksichtigung des Explosionsschutzes bei der Nutzung eines Knallgasgemisches als Substrat kann als weitere Schwierigkeit der lithoautotrophen PHB-Produktion genannt werden (Islam Mozumder *et al.*, 2015; Tanaka *et al.*, 1995). Durch eine elektroautotrophe Produktion von PHB könnten diese Nachteile relativiert werden. Auch in einem indirekten Elektrosyntheseprozess könnte ein kathodischer Biofilm den Wasserstoffpartialdruck geringhalten und somit die Entstehung eines explosionsfähigen Gasgemisches verhindern. In der Literatur können einige wenige Beispiele zur bioelektrochemischen Produktion von PHB gefunden werden (Alkotaini *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2018; Sydow *et al.*, 2017). Bei diesen Systemen handelt es sich jedoch um sekundäre METs, welche auf teure Katalysatoren oder

aufgereinigte Enzyme zur Produktion von PHB in einem mehrstufigen Prozess setzten. Die direkte Synthese von PHB durch einen kathodischen Biofilm konnte lediglich im photoelektrotrophen Purpurbakterium *R. palustris* nachgewiesen werden (Ranaivoarisoa *et al.*, 2019). Darüber hinaus verfolgen weitere Forschungsansätze eine rein phototrophe PHB-Produktion in Cyanobakterien (Markl *et al.*, 2019). Eine großtechnische Produktion erscheint jedoch unter Anbetracht der Lichtabhängigkeit dieser Prozesse schwer zu realisieren. In *R. palustris* ist die PHB-Syntheserate ebenfalls durch die geringen Stromdichten der Elektronenaufnahme von einer Kathode stark eingeschränkt (Guzman *et al.*, 2019). In der vorliegenden Arbeit konnten mit Hilfe einer Nilrot-Färbung PHB-Granula in den Zellen von kathodischen *K. spormannii*-Biofilmen detektiert werden (siehe Abb. 24 und Abb. 25). Die gesteigerte Expression der PHB-Synthesegene unter elektroautotrophen Bedingungen unterstützt diese Beobachtung. Allerdings ist aus den mikroskopischen Aufnahmen des kathodischen Biofilms auch ersichtlich, dass nicht alle Zellen im Biofilm PHB-Inklusionen aufweisen. Da die mikrobielle PHB-Einlagerung, wie bereits erwähnt, insbesondere durch Nährstofflimitationen hervorgerufen werden, könnten lokale Limitationen, beispielsweise von Stickstoffquellen im Biofilm, für diese Beobachtung verantwortlich gemacht werden. Die hohe Abweichung der Expressionswerte der PHB-Synthesegene zwischen den elektroautotrophen Replikaten der Transkriptomanalyse, können ebenfalls als Beleg einer strukturierten Umwelt im Biofilm interpretiert werden. Zur Steigerung der PHB-Syntheseleistung eines kathodischen *K. spormannii* Biofilms in einem kontinuierlichen System könnte beispielsweise eine alternierende Überströmung mit stickstofflimitiertem ES-Medium und unverändertem ES-Medium durchgeführt werden. Die konventionelle Aufreinigung von PHB aus mikrobieller Biomasse durch die Extraktion mit organischen Lösemittel, wie zum Beispiel Chloroform oder Methanol, trägt zum einen zu den hohen Prozesskosten der PHB-Synthese bei, zum anderen steht die Verwendung dieser toxischen Materialien im Gegensatz zu der angestrebten nachhaltigen Produktion des Biopolymers. Jedoch ist die Entwicklung umweltverträglicher Extraktionsmethoden von PHB derzeit Bestandteil vieler Forschungsvorhaben (Haddadi *et al.*, 2019). Die der Extraktion vorangestellte Zellernte, stellt eine weitere Herausforderung in einem kontinuierlichen, bioelektrochemischen System dar. Mithilfe einer beweglichen Schervorrichtung könnte der kathodische Biofilm zur optimalen Substratversorgung auf einer definierten Höhe gehalten und dabei überschüssige Biomasse geerntet werden. Eine weitere Möglichkeit zur Zellernte könnte durch eine temporäre Erhöhung der Fließgeschwindigkeit zum Abscheren des Biofilms erreicht werden. Zusammenfassend kann von einer hohen Nachfrage nach einem direkten, mikrobiellen Elektrosyntheseprozess zur Produktion von PHB aus den kostengünstigen Ressourcen CO₂ und elektrischem Strom ausgegangen werden. Die in

dieser Arbeit durchgeführten Experimente belegen, dass es sich bei *K. spormannii* um einen potenziellen Biokatalysator für solch einen zukünftigen Prozess handeln könnte, jedoch müssten weitere Versuche zum intensiveren Verständnis der PHB-Regulation in *K. spormannii* und zur Steigerung der elektroautotrophen PHB-Synthese durchgeführt werden.

4.5 Kultivierung von *K. spormannii* in bedruckbaren Fließzellen

Da in den vorangegangenen Versuchen Hinweise auf eine potenzielle Substratlimitation der kathodischen Biofilme erbracht werden konnten, wurde das Wachstum von *K. spormannii* in mit Druck beaufschlagbaren bioelektrochemischen Fließzellen untersucht. Aufgrund der erhöhten Löslichkeit wurde durch den angelegten Druck eine Verbesserung der Versorgung des Biofilms mit den gasförmigen Substraten und somit ein gesteigertes Biofilmwachstum erwartet. Während der Kultivierung in den Fließzellen konnte die Entwicklung eines mit bloßem Auge erkennbaren Biofilms mittels optischer Kohärenztomographie aufgezeichnet werden (siehe Abb. 23). Anhand fluoreszenzmikroskopischer Analysen konnte die Viabilität der Zellen bestätigt werden (siehe Abb. 25). Die nach zehn Tagen erreichte, durchschnittliche Biofilmhöhe von 80 µm (an der mittels OCT analysierten Stelle in der Mitte der planen Graphitkathode) übertrifft die Dicke der meisten in der Literatur beschriebenen kathodischen Biofilme deutlich. Im Vergleich zum Bedeckungsgrad und Volumen anodischer Biofilme aus MFCs sind die Kathoden mikrobieller Elektrosynthesesysteme typischerweise eher spärlich besiedelt (Rosenbaum & Franks, 2014). In einer weiteren Arbeit konnten ähnliche Biofilmdichten in einem, kontinuierlich ohne Überdruck betriebenen mikrobiellen Elektrosynthesesystem nach einer Betriebsdauer von einem Jahr gezeigt werden (Jourdin *et al.*, 2018). Die Ergebnisse von Jourdin und Kollegen verdeutlichen allerdings, dass allein die bessere Versorgung des Biofilms mit Nährmedium durch eine Überströmung einen deutlichen Effekt auf das Biofilmwachstum zeigen kann. So muss in weiteren Versuchen der Einfluss der Parameter Druck und Fließgeschwindigkeit auf das Biofilmwachstum in den vorgestellten Fließzellen analysiert werden. Insgesamt konnte mit den Fließzellen eine interessante, neuartige Plattform zur Charakterisierung aerober, elektroautotropher Mikroorganismen etabliert werden. Aufgrund des Einkammer-Aufbaus und des anodisch entstehenden Sauerstoffs ist der derzeitige Fließzellaufbau allerdings nicht zur Charakterisierung anaerober Mikroorganismen geeignet. Hierzu müssten die Anoden zunächst in eine protonenpermeable Membran eingehaust werden.

Aufgrund des hohen Energiebedarfs zur Synthese eines funktionalen Enzym-Setups unterliegt die Expression des Calvin-Zyklus einer strikten Regulation (Van Keulen *et al.*, 1998; Michelet *et al.*, 2013). Unter elektroautotrophen Bedingungen konnte ein vollständig exprimierter Calvin-Zyklus nachgewiesen werden. Ferner befand sich die RuBisCO unter den 40 am stärksten exprimierten Genen. Dies konnte als erster Hinweis einer kathodischen CO₂-Fixierung durch *K. spormannii* gewertet werden. Bemerkenswerterweise konnten in der Literatur keine Transkriptomdaten einer elektroautotrophen Reinkultur gefunden werden, welche zur vergleichenden Diskussion hätten herangezogen werden können. Durch die Ergebnisse des Kohlenstoffisotopenexperimentes wurde ein finaler Nachweis der CO₂-Fixierung des kathodischen Biofilms erbracht. Während in sämtlichen Arbeiten zur mikrobiellen Elektrosynthese der Nachweis einer CO₂-Fixierung vernachlässigt oder nur indirekt über die Bestimmung der Acetat bzw. Methankonzentration erbracht wurde (siehe auch Abb. 5), kann das Ergebnis des Isotopenexperimentes als ein klarer Nachweis einer anabolen CO₂-Fixierung gewertet werden. So besteht keine Klarheit ob in acetogenen oder methanogenen Organismen CO₂ lediglich als Akzeptor einer anaeroben Atmung reduziert wird, oder ob der reduzierte Kohlenstoff auch in Form von Acetyl-CoA in den Metabolismus aufgenommen wird. Der Vollständigkeit wegen muss an dieser Stelle jedoch die Arbeit von Guzman und Kollegen erwähnt werden, in welcher die kathodische CO₂-Fixierung durch einen photoautotrophen Biofilm anhand einer Inkorporation von ¹³C-markiertem CO₂ belegt wurde (Guzman *et al.*, 2019).

Anhand des gemessenen Unterschiedes im ¹³C-Gehalt der Biomasse des Inokulums und der Biomasse des kathodischen Biofilms kann eine Näherung der coulombschen Effizienz und der Umsatzrate der CO₂-Fixierung durch *K. spormannii* ermittelt werden. Aufgrund der Unschärfe soll diese Näherung lediglich in der Diskussion aufgeführt und anschließend mit den Werten etablierter Elektrosynthesysteme verglichen werden. Durch Integration der chronoamperometrischen Daten der Fließzellkultivierung lässt sich eine Gesamtladung von 1425,83 C bestimmen, welche über die Inkubationsdauer von 10 Tagen bei einem Potential von -500 mV vs. SHE von der Kathode abgegeben wurde (siehe Appendix, Abb. 31). Dies entspricht der Ladung von $1,48 \times 10^{-2}$ mol Elektronen. Die Trockenmasse des geernteten Biofilms betrug 15 mg. Näherungsweise kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei 50 % der bakteriellen Zelltrockenmasse um Kohlenstoff handelt (Bratbak & Dundas, 1984). Dies entspricht einem theoretischen Gesamtkohlenstoffgehalt von 7,5 mg in der Zelltrockenmasse des geernteten Biofilms. Anhand der Isotopenanalyse konnte eine Zunahme von 42 % ¹³C in der Biomasse des Biofilms detektiert werden. Unter der Annahme,

dass keine Änderung der zellulären Isotopenzusammensetzung durch den reinen Zellerhalt stattfindet, kann somit von einem Zuwachs von 3,15 mg ^{12}C -Kohlenstoff durch die Fixierung von $^{12}\text{CO}_2$ ausgegangen werden. Dies entspricht $2,63 \times 10^{-4}$ mol an fixiertem Kohlenstoff. Da für die Reduktion eines Moleküls CO_2 in Zellbiomasse näherungsweise vier Elektronen benötigt werden, entspricht die Anzahl der für diesen Reduktionsprozess benötigten Elektronen $1,05 \times 10^{-3}$ mol (Dick, 2014). Aus den bestimmten Näherungen lässt sich eine coulombsche Effizienz von ca. 7 % berechnen. Dies bedeutet, dass 7 % aller im bioelektrochemischen System verbrauchten Elektronen in der Biomasse von *K. spormannii* „wiedergefunden“ werden konnten. Verglichen mit den coulombschen Effizienzen, welche bereits in anaeroben Elektrosynthesystemen erreicht werden konnten (>90 %), erscheint dieser Wert zunächst gering (Aryal, Ammam, *et al.*, 2017). Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass während der Wachstumsphase des *K. spormannii*-Biofilms – bedingt durch den zunächst geringen Bedeckungsgrad – ein vermutlich entscheidender Teil der Elektronen einer abiotischen, kathodischen Sauerstoffreduktionsreaktion zugeführt wurden. In einer kontinuierlichen, biotechnologischen Anwendung hingegen wäre aufgrund der vollständigen Bedeckung der Kathode von einem geringeren Elektronenverlust auszugehen. Darüber hinaus wurde nur die Biomasse der Zellen im Biofilm bestimmt. Zellen, welche möglicherweise durch die hohe Fließgeschwindigkeit in die planktonische Phase abgeschert wurden, fanden keine Berücksichtigung im Rahmen des Inkorporationsexperiments. Somit könnte die tatsächlich fixierte Menge an CO_2 höher liegen.

Die coulombsche Effizienz kann nicht als alleiniges Bewertungskriterium eines Elektrosyntheseprozesses herangezogen werden. So erscheint ein bioelektrochemischer Prozess mit einer hohen coulombschen Effizienz und aber nur einer geringen Umsatzrate (pro Kathodenfläche und Zeit) als wirtschaftlich nicht rentabel. Ähnlich wie bei der Bestimmung der coulombschen Effizienz, kann auch die Umsatzrate der CO_2 -Fixierung von *K. spormannii* näherungsweise bestimmt werden. Als erste Grundannahme dient auch hier die Masse an fixiertem Kohlenstoff von 3,15 mg über einen Zeitraum von 10 Tagen. Dies entspricht einer Kohlenstofffixierungsrate von $0,315 \text{ mg Tag}^{-1}$. Normalisiert auf einen Quadratmeter Kathodenfläche ergibt sich eine Rate von $157 \text{ mg m}^{-2} \text{ Tag}^{-1}$. Zur besseren Vergleichbarkeit kann diese Kohlenstofffixierungsrate auch in $0,013 \text{ mol}(\text{CO}_2) \text{ m}^{-2} \text{ Tag}^{-1}$ angegeben werden. Dies ist vergleichbar mit den Umsatzraten früher Arbeiten zur anaeroben, mikrobiellen Elektrosynthese von Acetat ($0,0014 - 0,046 \text{ mol}(\text{CO}_2) \text{ m}^{-2} \text{ Tag}^{-1}$). In diesen Arbeiten diente ebenfalls ein planarer, unbehandelte Graphitblock als Kathode bei einem ähnlichen Potential von -400 mV vs. SHE (Kuroda & Watanabe, 1995; Nevin *et al.*,

2010). Durch die Verwendung von strukturell aufwändigen (z.B. *Carbon Nano Tubes*) oder funktionalisierten Graphitkathoden konnten mittlerweile (bei deutlich niedrigeren Potentialen von bis zu -1300 mV vs. SHE) Umsatzraten von bis zu 44,3 mol(CO₂) m⁻² Tag⁻¹ durch elektroautotrophe, acetogene Organismen erzielt werden (Jourdin *et al.*, 2016). Dies lässt das Optimierungspotential der CO₂-Fixierung durch *K. spormannii* mittels niedrigerer Potentiale oder modifizierter Graphitkathoden erahnen.

4.6 Evaluation der Verwendung von Knallgasbakterien als Biokatalysator in einem mikrobiellen Elektrosyntheseprozess

In der Literatur sind nur drei Beispiele aerober, vermutlich elektroautotropher Organismen zu finden. Dabei handelt es sich um eisenoxidierende Mikroorganismen wie *Acidithiobacillus ferrooxydans*, *Mariprofundus ferrooxydans* und das phototrophe Bakterium *Rhodospseudomonas palustris*. Obgleich die Kultivierung einiger Knallgasbakterien in aeroben bioelektrochemischen Systemen untersucht wurde, ist derzeit kein elektroautotrophes Knallgasbakterium in der Literatur beschrieben. So konnte in den elektroautotrophen Kultivierungsversuchen der Knallgasbakterien *Cupriavidus necator* oder *Cupriavidus metallidurans* keine im Vergleich zur abiotischen Medienkontrolle gesteigerten Stromdichten in einem bioelektrochemischen System beobachtet werden (siehe Abb. 5). Des Weiteren konnte für keinen der genannten aeroben Organismen – mit Ausnahme des unter photoelektrotrophen Bedingungen kultivierten Bakteriums *R. palustris* – der Nachweis einer an einen Elektronenverbrauch gekoppelten, kathodischen CO₂-Fixierung erbracht werden. Somit handelt es sich bei dem in dieser Arbeit charakterisierten Organismus, *K. spormannii*, um das erste, beschriebene elektroautotrophe Knallgasbakterium. Daher sollen im finalen Abschnitt dieser Arbeit, aufgrund der Vorreiterrolle dieses Isolates, die Vor- und Nachteile der Verwendung von Knallgasbakterien als Biokatalysator in einem aeroben, bioelektrochemischen System abschließend diskutiert werden:

Die für die kathodische CO₂-Fixierung von *K. spormannii* in Kapitel 4.5 näherungsweise bestimmte coulombsche Effizienz liegt sichtlich unter den coulombschen Effizienzen, welche bereits für die anaerobe Acetat- oder Methanproduktion durch acetogene bzw. methanogene, elektroautotrophe Organismen erzielt werden können. Obgleich eine signifikante Steigerung dieser Effizienz durch die Verwendung neuartiger Kathodenmaterialien und der Nutzung niedrigerer Potentiale zu erwarten ist, wird bei der biotechnologischen Nutzung elektroautotropher Knallgasbakterien zwangsläufig ein Teil der verbrauchten Elektronen nicht im Produkt gebunden sein. Dies kann darauf

zurückgeführt werden, dass in Knallgasbakterien ein Teil der aufgenommenen Elektronen zur zellulären ATP-Synthese über die Atmungskette auf Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor übertragen werden müssen. Coulombsche Effizienzen von annähernd hundert Prozent, wie in der anaeroben Elektrosynthese von Methan oder Acetat, sind aufgrund dieser physiologischen Limitation ausgeschlossen. Darüber hinaus muss aufgrund der Oxygenase-Nebenaktivität der RuBisCO ein zusätzlicher Elektronenverlust bei der Fixierung von CO₂ über den Calvin-Zyklus in Kauf genommen werden. Da es sich bei der CO₂-Fixierung durch Knallgasbakterien im Gegensatz zur Acetat- und Methanproduktion durch Wood-Ljungdahl-Pathway nutzende Organismen nicht um einen katabolen Prozess handelt, geht die Synthese eines potenziellen Produktes (zum Beispiel PHB) zumeist mit einer Biomasseproduktion einher. Durch optimale Prozessbedingungen oder *Genetic Engineering* könnte diese Biomasseproduktion jedoch auf ein zum Biofilmerhalt notwendiges Minimum reduziert werden. Diese Regeneration des Biokatalysators kann jedoch auch als Vorteil gegenüber acetogenen oder methanogenen Mikroorganismen aufgeführt werden, welchen bei hohen coulombschen Effizienzen durch die geringe anaplerotische CO₂-Fixierung kaum Kohlenstoff zum Selbsterhalt zur Verfügung steht. Die oben genannte Sauerstoffabhängigkeit resultiert jedoch auch in einer Sauerstofftoleranz elektroautotropher Knallgasbakterien, welche eine direkte Nutzung realer CO₂-Abgasströme erlaubt, wie in dieser Arbeit anhand des Wachstumsversuch von *K. spormannii* mit Rauchgas eines Kohlekraftwerks als alleinige Kohlenstoffquelle demonstriert werden konnte. Darüber hinaus kann anoxischen CO₂-Abgasströmen kostengünstig Luftsauerstoff zugeführt werden, wohingegen eine Sauerstoffabreinigung aus aeroben CO₂-Abgasströmen zur Nutzung durch anaerobe Mikroorganismen durch einen hohen Kosteneinsatz und zusätzlichen Energieeintrag erwirkt werden müsste. Ferner resultiert die Verwendung von Sauerstoff als Elektronenakzeptor eines mikrobiellen Elektrosyntheseprozesses in einem deutlich größeren thermodynamischen Fenster zur Energiekonservierung, welches die anabole Produktsynthese komplexer, energiereicher Verbindungen in Knallgasbakterien erst ermöglicht: Aufgrund der geringen Energieausbeute der Carbonat-Atmung acetogener oder methanogener Organismen steht diesen Organismen vermutlich weniger Energie für anabole Synthesen zur Verfügung als Knallgasbakterien. Bei der Synthese aufwendiger Produkte, wie zum Beispiel PHB, müsste diese Energiedifferenz durch einen hohen katabolen Stoffumsatz kompensiert werden, wodurch der Großteil des fixierten Kohlenstoffes als Atmungsendprodukt ausgeschieden werden würde und somit nicht zur Synthese des eigentlichen Produktes genutzt werden könnte. So kann die in dieser Arbeit gezeigte Fähigkeit von *K. spormannii* zur elektroautotrophen Synthese längererkettiger Kohlenstoffverbindungen, wie zum Beispiel PHB-haltiger Biomasse, als ein weiterer

entscheidender Vorteil gegenüber den bisher beschriebenen elektroautotrophen Organismen aufgeführt werden.

Zusammenfassend kann an dieser Stelle festgehalten werden, dass es sich bei der mikrobiellen Elektrosynthese durch elektroautotrophe Knallgasbakterien um eine interessante und vielversprechende CCU-Technologie für die direkte Konversion sauerstoffhaltiger CO₂-Abgasströme in komplexe organische Verbindungen handelt. Durch die Ergebnisse dieser Arbeit konnte sowohl eine Steigerung der Produktpalette als auch eine Erweiterung der Anwendungsmöglichkeiten der mikrobiellen Elektrosynthese angestoßen werden. Elektroautotrophe Knallgasbakterien wie *K. spormannii* stehen allerdings nicht in einer direkten Konkurrenz mit anaeroben, elektroautotrophen Mikroorganismen. Vielmehr wird die Wahl des geeigneten Biokatalysators zur mikrobiellen Elektrosynthese durch das angestrebte Produkt sowie von den vorgegebenen Prozessanforderungen bestimmt.

4.7 Ausblick

Die Entwicklung eines genetischen Systems stellt den wichtigsten Schritt zur weiteren Charakterisierung und Entwicklung von *K. spormannii* dar. Zum einen könnte anhand einer Hydrogenase-Deletionsmutante die in dieser Arbeit postulierte hydrogenase-vermittelte Elektronenaufnahme untersucht werden. Darüber hinaus könnte der Effekt einer Überexpression der [NiFe]-Hydrogenase auf den Stromverbrauch in einem bioelektrochemischen System untersucht werden. Des Weiteren konnte in anderen Arbeiten mit *C. necator* eine deutliche Steigerung der lithoautotrophen PHB-Produktion durch eine Überexpression der RuBisCO gezeigt werden. Im Falle der angestrebten elektroautotrophen PHB-Produktion durch *K. spormannii* müssten weitere Versuche zur Aufklärung der PHB-Regulationsmechanismen in *K. spormannii* durchgeführt werden. Daneben ist eine Überexpression der PHB-Synthesegene ebenfalls denkbar. Bei der Entwicklung von *K. spormannii* zu einem Chassis-Organismus der elektroautotrophen Biotechnologie müssten diese Gene allerdings deletiert werden, da es sich dann bei PHB um eine unerwünschte Kohlenstoffsenke handeln würde. Mit Hilfe synthetischer Biologie könnten unterschiedliche Produktionsstämme generiert werden und so die Produktpalette der mikrobiellen Elektrosynthese immens bereichert werden.

Des Weiteren sollte die Arbeit an den bioelektrochemischen Fließzellen fortgeführt werden. So ist die Bestimmung des Einflusses der unterschiedlichen Systemparameter (Fließgeschwindigkeit, Druck, Potential, Medienzusammensetzung) auf das Biofilmwachstum und die PHB-Produktion zur Entwicklung eines industriellen Prozesses auf Basis einer skalierbaren Reaktortechnik unerlässlich.

Das exemplarische Steigerungspotential der in dieser Arbeit erreichten Umsatzraten soll in Abb. 33 am Beispiel anaerober, elektroautotropher Organismen aufgezeigt werden. So konnte in anaeroben, acetatproduzierenden Systemen bereits eine beträchtliche Steigerung der Umsatzraten durch das Anlegen niedrigerer Potentiale an modifizierten Graphitkathoden erreicht werden.

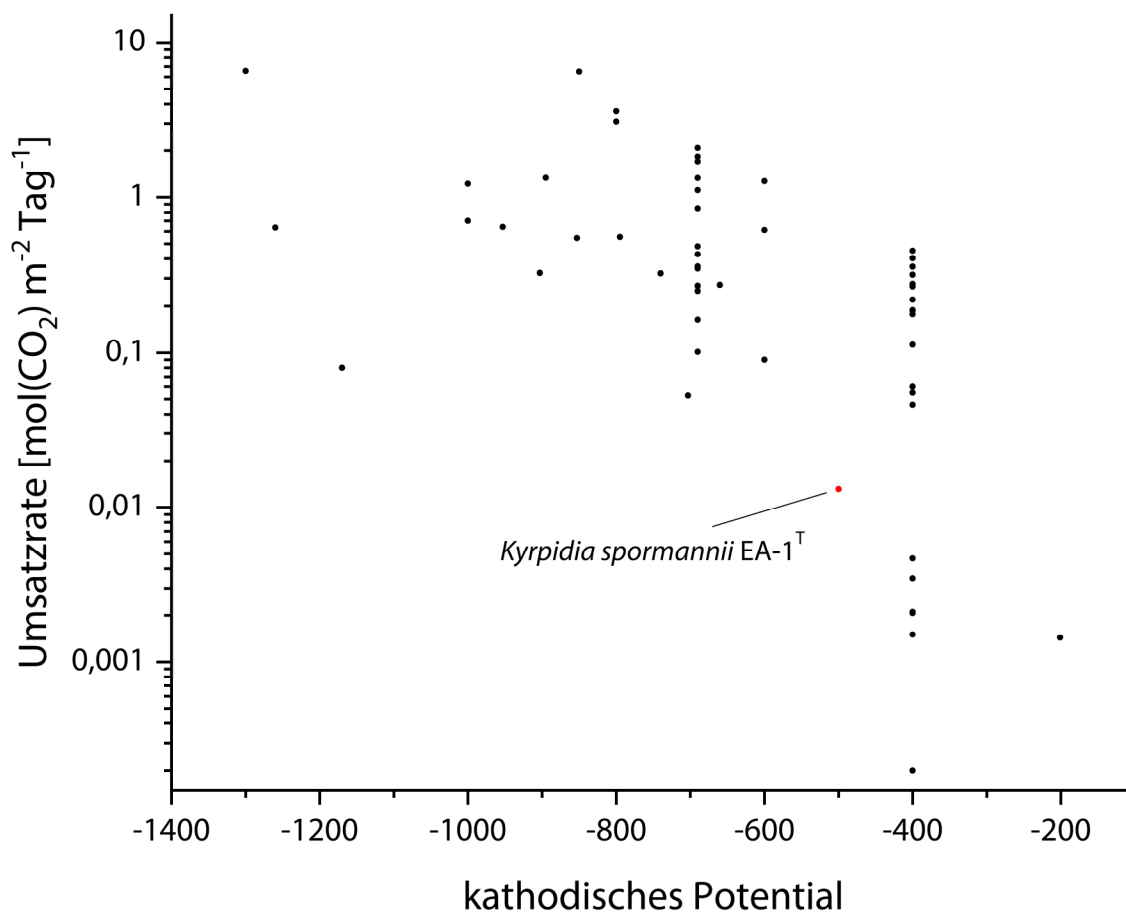


Abb. 33: Abhängigkeit der Umsatzrate acetogener mikrobieller Elektrosynthesysteme von dem dabei verwendeten kathodischen Potential. Die Daten wurden einer tabellarischen Übersicht aus Aryal et al. entnommen (Aryal, Ammam, et al., 2017).

V. REFERENZEN

- Alkotaini, B., Abdellaoui, S., Hasan, K., Grattieri, M., Quah, T., Cai, R. *et al.* (2018). Sustainable Bioelectrosynthesis of the Bioplastic Polyhydroxybutyrate: Overcoming Substrate Requirement for NADH Regeneration. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 6(4), 4909–4915. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b04392>
- Almpanis, A., Swain, M., Gatherer, D. & McEwan, N. (2018). Correlation between bacterial G+C content, genome size and the G+C content of associated plasmids and bacteriophages. *Microbial genomics*, 4(4). NLM (Medline). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000168>
- Andrews, A. E., Kofler, J. D., Trudeau, M. E., Williams, J. C., Neff, D. H., Masarie, K. A. *et al.* (2014). CO₂, CO, and CH₄ measurements from tall towers in the NOAA earth system research laboratory's global greenhouse gas reference network: Instrumentation, uncertainty analysis, and recommendations for future high-accuracy greenhouse gas. *Atmospheric Measurement Techniques*, 7(2), 647–687. <https://doi.org/10.5194/amt-7-647-2014>
- Aryal, N., Ammam, F., Patil, S. A. & Pant, D. (2017). An overview of cathode materials for microbial electrosynthesis of chemicals from carbon dioxide. *Green Chemistry*, 19(24), 5748–5760. The Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/C7GC01801K>
- Aryal, N., Tremblay, P.-L., Lizak, D. M. & Zhang, T. (2017). Performance of different *Sporomusa* species for the microbial electrosynthesis of acetate from carbon dioxide. *Bioresource Technology*, 233, 184–190. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2017.02.128>
- Aulenta, F., Catervi, A., Majone, M., Panero, S., Reale, P. & Rossetti, S. (2007). Electron transfer from a solid-state electrode assisted by methyl viologen sustains efficient microbial reductive dechlorination of TCE. *Environmental Science and Technology*, 41(7), 2554–2559. <https://doi.org/10.1021/es0624321>
- B.J. Tindall. (1990). A Comparative Study of the Lipid Composition of *Halobacterium saccharovorum* from Various Sources. *Systematic and Applied Microbiology*, 13(2), 128–130. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80158-X](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80158-X)
- Bajracharya, S., ter Heijne, A., Dominguez Benetton, X., Vanbroekhoven, K., Buisman, C. J. N., Strik, D. P. B. T. B. *et al.* (2015). Carbon dioxide reduction by mixed and pure cultures in microbial electrosynthesis using an assembly of graphite felt and stainless steel as a cathode. *Bioresource Technology*, 195, 14–24. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2015.05.081>
- Bajracharya, S., Srikanth, S., Mohanakrishna, G., Zacharia, R., Strik, D. P. & Pant, D. (2017). Biotransformation of carbon dioxide in bioelectrochemical systems: State of the art and future prospects. *Journal of Power Sources*, 356, 256–273. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2017.04.024>
- Bar-Even, A., Flamholz, A., Noor, E. & Milo, R. (2012). Thermodynamic constraints shape the structure of carbon fixation pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1817(9), 1646–1659. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.05.002>
- Bard, A. J., Inzelt, G. & Scholz, F. (Hrsg.). (2012). *Electrochemical Dictionary* (2. Aufl.).

- Berlin/Heidelberg: Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-29551-5>
- Barham, P. J., Keller, A., Otun, E. L. & Holmes, P. A. (1984). Crystallization and morphology of a bacterial thermoplastic: poly-3-hydroxybutyrate. *Journal of Materials Science*, 19(9), 2781–2794. Kluwer Academic Publishers. <https://doi.org/10.1007/BF01026954>
- Barker, P. D. & Ferguson, S. J. (1999, Dezember 15). Still a puzzle: Why is haem covalently attached in c-type cytochromes? *Structure*. Current Biology Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)88334-3](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)88334-3)
- Batlle-Vilanova, P., Ganigué, R., Ramió-Pujol, S., Bañeras, L., Jiménez, G., Hidalgo, M. *et al.* (2017). Microbial electrosynthesis of butyrate from carbon dioxide: Production and extraction. *Bioelectrochemistry*, 117, 57–64. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/J.BIOELECHEM.2017.06.004>
- Batlle-Vilanova, P., Puig, S., Gonzalez-Olmos, R., Balaguer, M. D. & Colprim, J. (2016). Continuous acetate production through microbial electrosynthesis from CO₂ with microbial mixed culture. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 91(4), 921–927. Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/jctb.4657>
- Battchikova, N., Eisenhut, M. & Aro, E. M. (2011). Cyanobacterial NDH-1 complexes: Novel insights and remaining puzzles. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1807(8), 935–944. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.10.017>
- Beese-Vasbender, P. F., Grote, J.-P., Garrelfs, J., Stratmann, M. & Mayrhofer, K. J. J. (2015). Selective microbial electrosynthesis of methane by a pure culture of a marine lithoautotrophic archaeon. *Bioelectrochemistry*, 102, 50–55. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/J.BIOELECHEM.2014.11.004>
- Beese-Vasbender, P. F., Nayak, S., Erbe, A., Stratmann, M. & Mayrhofer, K. J. J. (2015). Electrochemical characterization of direct electron uptake in electrical microbially influenced corrosion of iron by the lithoautotrophic SRB *Desulfopila corrodens* strain IS4. *Electrochimica Acta*, 167, 321–329. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2015.03.184>
- Beliaev, A. S. & Saffarini, D. A. (1998). *Shewanella putrefaciens mtrB* encodes an outer membrane protein required for Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Journal of Bacteriology*, 180(23), 6292–6297.
- Beliaev, A. S., Saffarini, D. A., McLaughlin, J. L. & Hunnicutt, D. (2001). MtrC, an outer membrane decahaem c cytochrome required for metal reduction in *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Molecular Microbiology*, 39(3), 722–730. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02257.x>
- Benzing, T. (2019). Verband der Chemischen Industrie e.V. *Rohstoffbasis der chemischen Industrie: Daten und Fakten*. Zugriff am 18.8.2019. Verfügbar unter: <https://www.vci.de/top-themen/rohstoffbasis-der-chemischen-industrie.jsp>
- Berg, I. A. (2011). Ecological aspects of the distribution of different autotrophic CO₂ fixation pathways. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(6), 1925–1936. Am Soc Microbiol. <https://doi.org/10.1128/AEM.02473-10>
- Berg, I. A., Kockelkorn, D., Ramos-Vera, W. H., Say, R. F., Zarzycki, J., Hügler, M. *et al.* (2010). Autotrophic carbon fixation in archaea. *Nature Reviews Microbiology*, 8(6), 447–460.

- Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2365>
- Berrisford, J. M., Baradaran, R. & Sazanov, L. A. (2016). Structure of bacterial respiratory complex I. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1857(7), 892–901. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.01.012>
- Bian, B., Alqahtani, M. F., Katuri, K. P., Liu, D., Bajracharya, S., Lai, Z. *et al.* (2018). Porous nickel hollow fiber cathodes coated with CNTs for efficient microbial electrosynthesis of acetate from CO₂ using: *Sporomusa ovata*. *Journal of Materials Chemistry A*, 6(35). <https://doi.org/10.1039/c8ta05322g>
- Blasco-Gómez, R., Batlle-Vilanova, P., Villano, M., Balaguer, M. D., Colprim, J. & Puig, S. (2017). On the edge of research and technological application: A critical review of electromethanogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms18040874>
- Bonjour, F. & Aragno, M. (1984). *Bacillus tusciae*, a new species of thermoacidophilic, facultatively chemolithoautotrophic hydrogen oxidizing sporeformer from a geothermal area. *Archives of Microbiology*, 139(4), 397–401. Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/BF00408386>
- Borisov, V. B., Gennis, R. B., Hemp, J. & Verkhovsky, M. I. (2011). The cytochrome *bd* respiratory oxygen reductases. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1807(11), 1398–1413. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.06.016>
- Bose, A., Gardel, E. J., Vidoudez, C., Parra, E. A. & Girguis, P. R. (2014). Electron uptake by iron-oxidizing phototrophic bacteria. *Nature communications*, 5, 3391. <https://doi.org/10.1038/ncomms4391>
- Bosire, E. M. & Rosenbaum, M. A. (2017). Electrochemical potential influences phenazine production, electron transfer and consequently electric current generation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAY). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00892>
- Bratbak, G. & Dundas, I. (1984). Bacterial dry matter content and biomass estimations. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(4), 755–757.
- Buckel, W. & Thauer, R. K. (2018). Flavin-Based Electron Bifurcation, Ferredoxin, Flavodoxin, and Anaerobic Respiration With Protons (Ech) or NAD⁺ (Rnf) as Electron Acceptors: A Historical Review. *Frontiers in Microbiology*, 9, 401. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00401>
- Burke, G. R. & Moran, N. A. (2011). Massive genomic decay in *Serratia symbiotica*, a recently evolved symbiont of aphids. *Genome Biology and Evolution*, 3(1), 195–208. <https://doi.org/10.1093/gbe/evr002>
- Bursac, T., Gralnick, J. A. & Gescher, J. (2017). Acetoin production via unbalanced fermentation in *Shewanella oneidensis*. *Biotechnology and bioengineering*, 114(6), 1283–1289. Wiley Online Library. <https://doi.org/10.1002/bit.26243>
- Butler, C. S. & Lovley, D. R. (2016). How to Sustainably Feed a Microbe: Strategies for Biological Production of Carbon-Based Commodities with Renewable Electricity. *Frontiers in microbiology*, 7, 1879. Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01879>

- Butler, J. H. & Montzka, S. A. (2019). NOAA Earth System Research Laboratory. *The NOAA Annual Greenhouse Gas Index (AGGI)*. Zugriff am 8.8.2019. Verfügbar unter: <https://www.esrl.noaa.gov/gmd/aggi/aggi.html>
- de Campos Rodrigues, T. & Rosenbaum, M. A. (2014). Microbial Electroreduction: Screening for New Cathodic Biocatalysts. *ChemElectroChem*, 1(11), 1916–1922. Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/celec.201402239>
- Von Canstein, H., Ogawa, J., Shimizu, S. & Lloyd, J. R. (2008). Secretion of flavins by *Shewanella* species and their role in extracellular electron transfer. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(3), 615–623. <https://doi.org/10.1128/AEM.01387-07>
- Cao, X., Huang, X., Liang, P., Xiao, K., Zhou, Y., Zhang, X. et al. (2009). A new method for water desalination using microbial desalination cells. *Environmental science & technology*, 43(18), 7148–7152. ACS Publications. <https://doi.org/10.1021/es901950j>
- Carbajosa, S., Malki, M., Caillard, R., Lopez, M. F., Palomares, F. J., Martín-Gago, J. A. et al. (2010). Electrochemical growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on a graphite electrode for obtaining a biocathode for direct electrocatalytic reduction of oxygen. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(2), 877–880. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.07.037>
- Carlson, H. K., Iavarone, A. T., Gorur, A., Yeo, B. S., Tran, R., Melnyk, R. A. et al. (2012). Surface multiheme c-type cytochromes from *Thermincola potens* and implications for respiratory metal reduction by Gram-positive bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(5), 1702–1707. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112905109>
- Castro-Sowinski, S., Burdman, S., Matan, O. & Okon, Y. (2010). Natural Functions of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. In G.G.-Q. Chen (Hrsg.), *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications* (S. 39–61). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-03287-5_3
- Chen, X., Cao, Y., Li, F., Tian, Y. & Song, H. (2018). Enzyme-Assisted Microbial Electrosynthesis of Poly(3-hydroxybutyrate) via CO₂ Bioreduction by Engineered *Ralstonia eutropha*. *ACS Catalysis*, 8(5), 4429–4437. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acscatal.8b00226>
- Cheng, S. & Logan, B. E. (2011). High hydrogen production rate of microbial electrolysis cell (MEC) with reduced electrode spacing. *Bioresource technology*, 102(3), 3571–3574. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.025>
- Cheng, S., Xing, D., Call, D. F. & Logan, B. E. (2009). Direct biological conversion of electrical current into methane by electromethanogenesis. *Environmental Science and Technology*, 43(10), 3953–3958. <https://doi.org/10.1021/es803531g>
- Choi, O. & Sang, B.-I. (2016). Extracellular electron transfer from cathode to microbes: application for biofuel production. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 11. BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0426-0>
- Ciais, P., Sabine, C., Bala, G., Bopp, L., Brovkin, V., Canadell, J. et al. (2013). Carbon and other biogeochemical cycles. In T.F. Stocker, D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung et al. (Hrsg.), *Climate Change 2013 the Physical Science Basis: Working Group I Contribution to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate*

- Change*. Cambridge: Cambridge University Press.
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.015>
- Clauwaert, P., Rabaey, K., Aelterman, P., De Schamphelaire, L., Pham, T. H., Boeckx, P. *et al.* (2007). Biological denitrification in microbial fuel cells. *Environmental Science and Technology*, 41(9), 3354–3360. <https://doi.org/10.1021/es062580r>
- Corbella, C., Hartl, M., Fernandez-Gatell, M. & Puigagut, J. (2019). MFC-based biosensor for domestic wastewater COD assessment in constructed wetlands. *Science of The Total Environment*, 660, 218–226. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.347>
- Costa, N. L., Hermann, B., Fourmond, V., Faustino, M., Teixeira, M., Einsle, O. *et al.* (2019). How thermophilic Gram-positive organisms perform extracellular electron transfer: characterization of the cell surface terminal reductase OcwA. *mBio*, 10(4), e01210-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.01210-19>
- Covestro. (2019). CO₂ replaces oil in plastics. Zugriff am 20.8.2019. Verfügbar unter: <https://www.covestro.com/en/company/strategy/attitude/co2-dreams>
- Dangel, A. W. & Tabita, F. R. (2015). CbbR, the Master Regulator for Microbial Carbon Dioxide Fixation. (W. Margolin, Hrsg.) *Journal of Bacteriology*, 197(22), 3488–3498. <https://doi.org/10.1128/JB.00442-15>
- Deutzmann, J. S., Sahin, M. & Spormann, A. M. (2015). Extracellular enzymes facilitate electron uptake in biocorrosion and bioelectrosynthesis. *mBio*, 6(2), 1–8. American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/mBio.00496-15>
- Deutzmann, J. S. & Spormann, A. M. (2017). Enhanced microbial electrosynthesis by using defined co-cultures. *ISME Journal*, 11(3), 704–714. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.149>
- Dick, J. M. (2014). Average oxidation state of carbon in proteins. *Journal of the Royal Society, Interface*, 11(100), 20131095. England. <https://doi.org/10.1098/rsif.2013.1095>
- Dietrich, K., Dumont, M.-J., Del Rio, L. F. & Orsat, V. (2017). Producing PHAs in the bioeconomy — Towards a sustainable bioplastic. *Sustainable Production and Consumption*, 9, 58–70. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/J.SPC.2016.09.001>
- Dopson, M., Ni, G. & Sleutels, T. H. J. A. (2016). Possibilities for extremophilic microorganisms in microbial electrochemical systems. *FEMS microbiology reviews*, 40(2), 164–81. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv044>
- Doud, D. F. R. & Angenent, L. T. (2014). Toward Electrosynthesis with Uncoupled Extracellular Electron Uptake and Metabolic Growth: Enhancing Current Uptake with *Rhodospseudomonas palustris*. *Environmental Science and Technology Letters*, 1(9), 351–355. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/ez500244n>
- Du, C., Sabirova, J., Soetaert, W. & Ki Carol Lin, S. (2012). Polyhydroxyalkanoates Production From Low-cost Sustainable Raw Materials. *Current Chemical Biology*, 6(1), 14–25. <https://doi.org/10.2174/187231312799984394>
- Dumas, C., Basseguy, R. & Bergel, A. (2008). Microbial electrocatalysis with *Geobacter sulfurreducens* biofilm on stainless steel cathodes. *Electrochimica Acta*, 53(5), 2494–2500. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2007.10.018>

- El-Naggar, M. Y., Wanger, G., Leung, K. M., Yuzvinsky, T. D., Southam, G., Yang, J. *et al.* (2010). Electrical transport along bacterial nanowires from *Shewanella oneidensis* MR-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(42), 18127–18131. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004880107>
- Erb, T. J. & Zarzycki, J. (2018). A short history of RubisCO: the rise and fall (?) of Nature's predominant CO₂ fixing enzyme. *Current opinion in biotechnology*, 49, 100–107. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.07.017>
- European Commission. (2015). *Press release - Closing the loop: Commission adopts ambitious new Circular Economy Package to boost competitiveness, create jobs and generate sustainable growth.* (Pressemeldung). *NewEurope*. Brüssel. Verfügbar unter: <http://neurope.eu/wires/closing-the-loop-commission-adopts-ambitious-new-circular-economy-package-to-boost-competitiveness-create-jobs-and-generate-sustainable-growth/>
- FCCC. (2015). *Report of the Conference of the Parties on its twenty-first session, held in Paris from 30 November to 13 December 2015.* United Nations Framework Convention on Climate Change. Verfügbar unter: <https://unfccc.int/resource/docs/2015/cop21/eng/10a01.pdf>
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783–791. <https://doi.org/10.2307/2408678>
- Fischedick, M., Görner, K. & Thomeczek, M. (Hrsg.). (2015). *CO₂: Abtrennung, Speicherung, Nutzung: Ganzheitliche Bewertung im Bereich von Energiewirtschaft und Industrie* (1. Aufl.). Berlin: Springer Vieweg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-19528-0>
- Freguia, S., Rabaey, K., Yuan, Z. & Keller, J. (2007). Non-catalyzed cathodic oxygen reduction at graphite granules in microbial fuel cells. *Electrochimica Acta*, 53(2), 598–603. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2007.07.037>
- Friedman, E., Miller, K., Lipson, D. & Angenent, L. (2013). Potentiostatically poised electrodes mimic iron oxide and interact with soil microbial communities to alter the biogeochemistry of Arctic peat soils. *Minerals*, 3(3), 318–336. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- Fuchs, G. (2011). *Alternative Pathways of Carbon Dioxide Fixation: Insights into the Early Evolution of Life? Annual Review of Microbiology* (Band 65). <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102801>
- Fuchs, G., Eitinger, T., Heider, J., Börries, K., Kothe, E., Overmann, J. *et al.* (2017). *Allgemeine Mikrobiologie: Begründet von Hans-Günter Schlegel.* (G. Fuchs, Hrsg.) (10. Aufl.). Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Gallon, J. R. (1981). The oxygen sensitivity of nitrogenase: a problem for biochemists and micro-organisms. *Trends in Biochemical Sciences*. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(81\)90008-6](https://doi.org/10.1016/0968-0004(81)90008-6)
- Golitsch, F., Bücking, C. & Gescher, J. (2013). Proof of principle for an engineered microbial biosensor based on *Shewanella oneidensis* outer membrane protein complexes. *Biosensors and Bioelectronics*, 47, 285–291. Elsevier.
- Gralnick, J. A. & Newman, D. K. (2007). Extracellular respiration. *Molecular microbiology*, 65(1), 1–11. Wiley Online Library.

- Guzman, M. S., Rengasamy, K., Binkley, M. M., Jones, C., Ranaivoarisoa, T. O., Singh, R. *et al.* (2019). Phototrophic extracellular electron uptake is linked to carbon dioxide fixation in the bacterium *Rhodopseudomonas palustris*. *Nature Communications*, 10(1), 1355. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09377-6>
- Haddadi, M. H., Asadolahi, R. & Negahdari, B. (2019, Juli 1). The bioextraction of bioplastics with focus on polyhydroxybutyrate: a review. *International Journal of Environmental Science and Technology*. Center for Environmental and Energy Research and Studies. <https://doi.org/10.1007/s13762-019-02352-0>
- Hallenbeck, P. C., Grogger, M. & Veverka, D. (2014). Recent Advances in Microbial Electrocatalysis. *Electrocatalysis*, 5(4), 319–329. Springer US. <https://doi.org/10.1007/s12678-014-0198-x>
- Hänggi, U. (2014). Eigenschaften und Verarbeitung von PHB-Formulierungen. Zugriff am 28.10.2019. Verfügbar unter: http://www.biomer.de/SKZ_VORT.pdf
- Harrington, T. D., Mohamed, A., Tran, V. N., Biria, S., Gargouri, M., Park, J. J. *et al.* (2015). Neutral red-mediated microbial electrosynthesis by *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Zymomonas mobilis*. *Bioresource Technology*.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(52), 22169–22174. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900086106>
- Hasvold, Ø., Henriksen, H., Melvær, E., Citi, G., Johansen, B., Kjøningsen, T. *et al.* (1997). Sea-water battery for subsea control systems. *Journal of Power Sources*, 65(1–2), 253–261. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0378-7753\(97\)02477-4](https://doi.org/10.1016/S0378-7753(97)02477-4)
- Igarashi, K. & Kato, S. (2017, August 26). Extracellular electron transfer in acetogenic bacteria and its application for conversion of carbon dioxide into organic compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8421-3>
- IPCC. (2013). Summary for Policymakers. In T.F. Stocker, D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung *et al.* (Hrsg.), *Climate Change 2013 – The Physical Science Basis: Working Group I Contribution to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (S. 1–30). Cambridge: Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- IPCC. (2014). Summary for Policymakers. In O. Edenhofer, R. Pichs-Madruga, Y. Sokona, E. Farahani, S. Kadner, K. Seyboth *et al.* (Hrsg.), *Climate Change 2014: Mitigation of Climate Change. Contribution of Working Group III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (S. 1–32). Cambridge: Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2009.11.012>
- Ishii, T., Kawaichi, S., Nakagawa, H., Hashimoto, K. & Nakamura, R. (2015). From chemolithoautotrophs to electrolithoautotrophs: CO₂ fixation by Fe(II)-oxidizing bacteria coupled with direct uptake of electrons from solid electron sources. *Frontiers in Microbiology*, 6, 994. Frontiers. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00994>
- Islam Mozumder, M. S., Garcia-Gonzalez, L., Wever, H. De & Volcke, E. I. P. (2015). Poly(3-

- hydroxybutyrate) (PHB) production from CO₂: Model development and process optimization. *Biochemical Engineering Journal*, 98, 107–116. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.02.031>
- Jiang, Y. & Jianxiong Zeng, R. (2018). Expanding the product spectrum of value added chemicals in microbial electrosynthesis through integrated process design—A review. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.101>
- Jourdin, L., Freguia, S., Flexer, V. & Keller, J. (2016). Bringing High-Rate, CO₂-Based Microbial Electrosynthesis Closer to Practical Implementation through Improved Electrode Design and Operating Conditions. *Environmental Science and Technology*, 50(4), 1982–1989. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b04431>
- Jourdin, L., Raes, S. M. T., Buisman, C. J. N. & Strik, D. P. B. T. B. (2018). Critical Biofilm Growth throughout Unmodified Carbon Felts Allows Continuous Bioelectrochemical Chain Elongation from CO₂ up to Caproate at High Current Density. *Frontiers in Energy Research*, 6, 7. Frontiers. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2018.00007>
- Kämpfer, P. & Kroppenstedt, R. M. (1996). Numerical analysis of fatty acid patterns of coryneform bacteria and related taxa. *Canadian Journal of Microbiology*, 42(10), 989–1005. <https://doi.org/10.1139/m96-128>
- Kaneko, M., Ishikawa, M., Song, J., Kato, S., Hashimoto, K. & Nakanishi, S. (2017). Cathodic supply of electrons to living microbial cells via cytocompatible redox-active polymers. *Electrochemistry Communications*, 75, 17–20. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2016.12.002>
- Kankaanpää, P., Yang, B., Kallio, H., Isolauri, E. & Salminen, S. (2004). Effects of polyunsaturated fatty acids in growth medium on lipid composition and on physicochemical surface properties of lactobacilli. *Applied and environmental microbiology*, 70(1), 129–36. American Society for Microbiology (ASM). <https://doi.org/10.1128/AEM.70.1.129-136.2004>
- Kato, S. (2015). Biotechnological Aspects of Microbial Extracellular Electron Transfer. *Microbes and environments*, 30(2), 133–9. Nakanishi Printing. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME15028>
- Kato, S. (2016). Microbial extracellular electron transfer and its relevance to iron corrosion. *Microbial Biotechnology*. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12340>
- Kelly, G. J. (2018). Fischer-Tropsch synthesis - carbon monoxide hydrogenation. In S.D. Jackson (Hrsg.), *Hydrogenation: Catalysts and Processes* (1. Aufl.). Berlin: De Gruyter.
- Kember, M. R., Buchard, A. & Williams, C. K. (2011). Catalysts for CO₂/epoxide copolymerisation. *Chemical Communications*, 47(1), 141–163. Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/C0CC02207A>
- Van Keulen, G., Girbal, L., Van Den Bergh, E. R. E., Dijkhuizen, L. & Meijer, W. G. (1998). The LysR-type transcriptional regulator CbbR controlling autotrophic CO₂ fixation by *Xanthobacter flavus* is an NADPH sensor. *Journal of Bacteriology*, 180(6), 1411–1417.
- Kim, M., Oh, H. S., Park, S. C. & Chun, J. (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary*

- Microbiology*, 64(PART 2), 346–351. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.059774-0>
- Kimura, Z. I. & Okabe, S. (2013). *Hydrogenophaga electricum* sp. nov., isolated from anodic biofilms of an acetate-fed microbial fuel cell. *Journal of General and Applied Microbiology*, 59(4), 261–266. <https://doi.org/10.2323/jgam.59.261>
- Klenk, H. P., Lapidus, A., Chertkov, O., Copeland, A., del Rio, G. T., Nolan, M. *et al.* (2011). Complete genome sequence of the thermophilic, hydrogen-oxidizing *Bacillus tusciae* type strain (T2 T) and reclassification in the new genus, *Kyrpidia* gen. nov. as *Kyrpidia tusciae* comb. nov. *Standards in Genomic Sciences*, 5(1), 121–34. BioMed Central. <https://doi.org/10.4056/sigs.2144922>
- Koch, T., Scheelhaase, T., Jonas, N., Hungsberg, M. & Osswald, D. (2016). *Evaluation zur Nutzung von Kohlendioxid (CO₂) als Rohstoff in der Emscher-Lippe-Region - Erstellung einer Potentialanalyse*. WiN Emscher-Lippe GmbH / EPEA – Internationale Umweltforschung GmbH. Hamburg / Herten. Verfügbar unter: http://www.emscher-lippe.de/wp-content/uploads/2017/05/2017-05-03_Report-CO2-Potentialanalyse_final.pdf
- Koller, M., Salerno, A., Reiterer, A., Malli, H., Malli, K., Kettl, K. H. *et al.* (2012). Sugarcane as feedstock for biomediated polymer production. *Sugarcane: Production, Cultivation and Uses* (S. 105–136). Nova Science Publishers, Inc.
- Kotloski, N. J. & Gralnick, J. A. (2013). Flavin electron shuttles dominate extracellular electron transfer by *Shewanella oneidensis*. *mBio*, 4(1). <https://doi.org/10.1128/mBio.00553-12>
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Kuroda, M. & Watanabe, T. (1995). CO₂ reduction to methane and acetate using a bio-electro reactor with immobilized methanogens and homoacetogens on electrodes. *Energy Conversion and Management*, 36(6–9), 787–790. [https://doi.org/10.1016/0196-8904\(95\)00122-T](https://doi.org/10.1016/0196-8904(95)00122-T)
- Kurtz, D. M. (2004). Dioxygen-binding Proteins. *Comprehensive Coordination Chemistry II* (Band 8, S. 229–260). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/B0-08-043748-6/08171-8>
- Lee, M. J. & Zinder, S. H. (1988). Hydrogen partial pressures in a thermophilic acetate-oxidizing methanogenic coculture. *Applied and environmental microbiology*, 54(6), 1457–61.
- Li, H., Opgenorth, P. H., Wernick, D. G., Rogers, S., Wu, T. Y., Higashide, W. *et al.* (2012). Integrated electromicrobial conversion of CO₂ to higher alcohols. *Science*, 335(6076), 1596. <https://doi.org/10.1126/science.1217643>
- Li, X., Li, J., Hu, X., Huang, L., Xiao, J., Chan, J. *et al.* (2015). Differential roles of the hemerythrin-like proteins of *Mycobacterium smegmatis* in hydrogen peroxide and erythromycin susceptibility. *Scientific Reports*, 5. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/srep16130>
- Li, Z., Yang, J. & Loh, X. J. (2016, April 22). Polyhydroxyalkanoates: Opening doors for a sustainable future. *NPG Asia Materials*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/am.2016.48>

- Lienemann, M., Deutzmann, J. S., Milton, R. D., Sahin, M. & Spormann, A. M. (2018). Mediator-free enzymatic electrosynthesis of formate by the *Methanococcus maripaludis* heterodisulfide reductase supercomplex. *Bioresource Technology*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.036>
- Light, S. H., Su, L., Rivera-Lugo, R., Cornejo, J. A., Louie, A., Iavarone, A. T. *et al.* (2018). A flavin-based extracellular electron transfer mechanism in diverse Gram-positive bacteria. *Nature*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0498-z>
- Liu, J., Wang, Z., Belchik, S. M., Edwards, M. J., Liu, C., Kennedy, D. W. *et al.* (2012). Identification and characterization of MtoA: A decaheme c-type cytochrome of the neutrophilic Fe(II)-oxidizing bacterium *Sideroxydans lithotrophicus* ES-1. *Frontiers in Microbiology*, 3(FEB). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00037>
- Liu, Q., Liu, B., Li, W., Zhao, X., Zuo, W. & Xing, D. (2017). Impact of ferrous iron on microbial community of the biofilm in microbial fuel cells. *Frontiers in Microbiology*, 8(JUN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00920>
- Logan, B. E., Hamelers, B., Rozendal, R., Schröder, U., Keller, J., Freguia, S. *et al.* (2006). Microbial fuel cells: methodology and technology. *Environmental science & technology*, 40(17), 5181–5192. ACS Publications.
- Logan, B. E. & Rabaey, K. (2012). Conversion of wastes into bioelectricity and chemicals by using microbial electrochemical technologies. *Science*, 337(6095), 686–690. American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.1217412>
- Logan, B. E., Rossi, R., Ragab, A. & Saikaly, P. E. (2019, Mai 1). Electroactive microorganisms in bioelectrochemical systems. *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0173-x>
- Lohner, S. T., Deutzmann, J. S., Logan, B. E., Leigh, J. & Spormann, A. M. (2014). Hydrogenase-independent uptake and metabolism of electrons by the archaeon *Methanococcus maripaludis*. *ISME Journal*, 8(8), 1673–1681. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.82>
- Ma, F., Huang, H. & Xu, X. (2019). Material Removal Mechanisms of Cu–Co Metal-Powder Composite by Microorganisms. *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing-Green Technology*. Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1007/s40684-019-00110-8>
- Mall, A., Sobotta, J., Huber, C., Tschirner, C., Kowarschik, S., Bačnik, K. *et al.* (2018). Reversibility of citrate synthase allows autotrophic growth of a thermophilic bacterium. *Science (New York, N.Y.)*, 359(6375), 563–567. American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.aao2410>
- Malvankar, N. S. & Lovley, D. R. (2014). Microbial nanowires for bioenergy applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 27, 88–95. Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2013.12.003>
- Markl, E., Grünbichler, H. & Lackner, M. (2019). Cyanobacteria for PHB Bioplastics Production: A Review. *Algae*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81536>
- McIlvaine, T. C. (1921). A buffer solution for colorimetric comparison. *J. Biol. Chem.*, 49, 183–186. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>

- Meessen, J. H. (2010). Urea. In G. Bellussi, M. Bohnet, J. Bus, K. Drauz, H. Greim, K.-P. Jäckel et al. (Hrsg.), *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (7. Aufl.). https://doi.org/doi:10.1002/14356007.a27_333.pub2
- Meier-Kolthoff, J. P. & Göker, M. (2019). TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nature Communications*, 10(1). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10210-3>
- Methé, 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*, 302(5652), 1967–1969. <https://doi.org/10.1126/science.1088727>
- Michelet, L., Zaffagnini, M., Morisse, S., Sparla, F., Pérez-Pérez, M. E., Francia, F. et al. (2013). Redox regulation of the Calvin–Benson cycle: something old, something new. *Frontiers in Plant Science*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00470>
- Mohanakrishna, G., Seelam, J. S., Vanbroekhoven, K. & Pant, D. (2015). An enriched electroactive homoacetogenic biocathode for the microbial electrosynthesis of acetate through carbon dioxide reduction. *Faraday Discuss.*, 183(0), 445–462. The Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/C5FD00041F>
- Mohidin Batcha, A. F., Prasad, D. M. R., Khan, M. R. & Abdullah, H. (2014). Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) by *Cupriavidus necator* H16 from jatropha oil as carbon source. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-1066-4>
- Możejko-Ciesielska, J. & Kiewisz, R. (2016). Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? *Microbiological Research*, 192, 271–282. Urban & Fischer. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2016.07.010>
- Muradov, N. Z. & Veziroglu, T. N. (2005). From hydrocarbon to hydrogen--carbon to hydrogen economy. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30(3), 225–237. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2004.03.033>
- Musto, H., Naya, H., Zavala, A., Romero, H., Alvarez-Valín, F. & Bernardi, G. (2006, August 18). Genomic GC level, optimal growth temperature, and genome size in prokaryotes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.06.054>
- Myers, C. R. & Myers, J. M. (2003). Cell surface exposure of the outer membrane cytochromes of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Letters in Applied Microbiology*, 37(3), 254–258. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01389.x>
- Myers, J. M. & Myers, C. R. (2000). Role of the tetraheme cytochrome CymA in anaerobic electron transport in cells of *Shewanella putrefaciens* MR-1 with normal levels of menaquinone. *Journal of Bacteriology*, 182(1), 67–75. American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/JB.182.1.67-75.2000>
- Nevin, K. P., Hensley, S. A., Franks, A. E., Summers, Z. M., Ou, J., Woodard, T. L. et al. (2011). Electrosynthesis of organic compounds from carbon dioxide is catalyzed by a diversity of acetogenic microorganisms. *Applied and environmental microbiology*, 77(9), 2882–6. American Society for Microbiology (ASM). <https://doi.org/10.1128/AEM.02642-10>
- Nevin, K. P., Woodard, T. L., Franks, A. E., Summers, Z. M. & Lovley, D. R. (2010). Microbial

- electrosynthesis: Feeding microbes electricity to convert carbon dioxide and water to multicarbon extracellular organic compounds. *mBio*, 1(2), e00103-10. American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/mBio.00103-10>
- North, M. (2014). What is CO₂? Thermodynamics, Basic Reactions and Physical Chemistry. In P. Styring, E.A. Quadrelli & K. Armstrong (Hrsg.), *Carbon Dioxide Utilisation: Closing the Carbon Cycle* (1. Aufl.). Amsterdam: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62746-9.00001-3>
- O'leary, W. M. (1962). THE FATTY ACIDS OF BACTERIA. *Bacteriological reviews*, 26(4), 421–47. American Society for Microbiology (ASM).
- Olhoff, A. & Christensen, J. (2019). *Emissions Gap Report 2018*. (J. Christensen, N.K. Dubash, T. Krug, H. Lehmann, J. Liu, S. Maxwell et al., Hrsg.). United Nations Environment Programme. <https://doi.org/10.18356/08bd6547-en>
- Overton, T. W., Justino, M. C., Li, Y., Baptista, J. M., Melo, A. M. P., Cole, J. A. et al. (2008). Widespread distribution in pathogenic bacteria of di-iron proteins that repair oxidative and nitrosative damage to iron-sulfur centers. *Journal of bacteriology*, 190(6), 2004–13. American Society for Microbiology (ASM). <https://doi.org/10.1128/JB.01733-07>
- Palanivelu, K. (2017). Climate Change Mitigation via Utilization of Carbon Dioxide. In M. Goel & M. Sudhakar (Hrsg.), *Carbon Utilization* (1. Aufl.). Singapore: Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-10-3352-0_9
- Paquete, C. M., Fonseca, B. M., Cruz, D. R., Pereira, T. M., Pacheco, I., Soares, C. M. et al. (2014). Exploring the molecular mechanisms of electron shuttling across the microbe/metal space. *Frontiers in Microbiology*, 5(JUN). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00318>
- Patil, S. A., Gildemyn, S., Pant, D., Zengler, K., Logan, B. E. & Rabaey, K. (2015). A logical data representation framework for electricity-driven bioproduction processes. *Biotechnology Advances*, 33(6), 736–744. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2015.03.002>
- Pirbadian, S., Barchinger, S. E., Leung, K. M., Byun, H. S., Jangir, Y., Bouhenni, R. A. et al. (2014). *Shewanella oneidensis* MR-1 nanowires are outer membrane and periplasmic extensions of the extracellular electron transport components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(35), 12883–12888. National Academy of Sciences. <https://doi.org/10.1073/pnas.1410551111>
- Qiao, Y. J., Qiao, Y., Zou, L., Wu, X. S. & Liu, J. H. (2017). Biofilm promoted current generation of *Pseudomonas aeruginosa* microbial fuel cell via improving the interfacial redox reaction of phenazines. *Bioelectrochemistry*, 117, 34–39. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2017.04.003>
- Qin, Y., Sheng, X., Liu, S., Ren, G., Wang, X. & Wang, F. (2015). Recent advances in carbon dioxide based copolymers. *Journal of CO₂ Utilization*, 11, 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2014.10.003>
- Rabaey, K., Boon, N., Höfte, M. & Verstraete, W. (2005). Microbial phenazine production enhances electron transfer in biofuel cells. *Environmental Science and Technology*, 39(9), 3401–3408. <https://doi.org/10.1021/es048563o>

- Rabaey, K., Bützer, S., Brown, S., Keller, J. & Rozendal, R. A. (2010). High current generation coupled to caustic production using a lamellar bioelectrochemical system. *Environmental Science and Technology*, 44(11), 4315–4321. <https://doi.org/10.1021/es9037963>
- Rabaey, K., Girguis, P. & Nielsen, L. K. (2011). Metabolic and practical considerations on microbial electrosynthesis. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(3), 371–377. Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2011.01.010>
- Rabaey, K., Read, S. T., Clauwaert, P., Freguia, S., Bond, P. L., Blackall, L. L. *et al.* (2008). Cathodic oxygen reduction catalyzed by bacteria in microbial fuel cells. *The ISME Journal*, 2(5), 519–527. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.1>
- Rachow, F. (2017). *Prozessoptimierung für die Methanisierung von CO₂ - vom Labor zum Technikum*. (Dissertation). BTU Cottbus-Senftenberg, Fakultät für MINT.
- Ragsdale, S. W. (1997). The eastern and western branches of the Wood/Ljungdahl pathway: how the east and west were won. *BioFactors (Oxford, England)*, 6(1), 3–11. Netherlands.
- Ranaivoarisoa, T. O., Singh, R., Rengasamy, K., Guzman, M. S. & Bose, A. (2019). Towards sustainable bioplastic production using the photoautotrophic bacterium *Rhodospseudomonas palustris* TIE-1. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s10295-019-02165-7>
- Reasoner, D. J. & Geldreich, E. E. (1985). A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(1), 1–7.
- Reiner, J. E. (2015). *Isolierung von elektroautotrophen Mikroorganismen*. Karlsruher Institut für Technologie.
- Reiner, J. E., Jung, T., Lapp, C. J., Siedler, M., Bunk, B., Overmann, J. *et al.* (2018). *Kyrpidia spormannii* sp. nov., a thermophilic, hydrogen-oxidizing, facultative autotroph, isolated from hydrothermal systems at São Miguel Island, and emended description of the genus *Kyrpidia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(12), 3735–3740. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003037>
- Renslow, R., Donovan, C., Shim, M., Babauta, J., Nannapaneni, S., Schenk, J. *et al.* (2011). Oxygen reduction kinetics on graphite cathodes in sediment microbial fuel cells. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 13(48), 21573–21584. <https://doi.org/10.1039/c1cp23200b>
- Revelo Romo, D. M., Hurtado Gutiérrez, N. H., Ruiz Pazos, J. O., Pabón Figueroa, L. V. & Ordóñez Ordóñez, L. A. (2019). Bacterial diversity in the Cr(VI) reducing biocathode of a Microbial Fuel Cell with salt bridge. *Revista Argentina de Microbiología*, 51(2), 110–118. Asociacion Argentina de Microbiologia. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.04.005>
- Rhuland, L. E., Work, E., Denman, R. F. & Hoare, D. S. (1955). The Behavior of the Isomers of α,ϵ -Diaminopimelic Acid on Paper Chromatograms. *Journal of the American Chemical Society*, 77(18), 4844–4846. <https://doi.org/10.1021/ja01623a047>
- Riedel, S. L., Bader, J., Brigham, C. J., Budde, C. F., Yusof, Z. A. M., Rha, C. *et al.* (2012). Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by *Ralstonia eutropha* in high cell density palm oil fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(1), 74–83. <https://doi.org/10.1002/bit.23283>

- Rodriguez-Concepcion, M., Avalos, J., Bonet, M. L., Boronat, A., Gomez-Gomez, L., Hornero-Mendez, D. *et al.* (2018, April 1). A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health. *Progress in Lipid Research*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.04.004>
- Roland-Holst, D. W. (2013). *Bioplastics in California: Economic Assessment of Market Conditions for PHA/PHB Bioplastics Produced from Waste Methane: Contractor's Report*. Department of Resources Recycling and Recovery.
- Rosenbaum, M. A. & Franks, A. E. (2014). Microbial catalysis in bioelectrochemical technologies: status quo, challenges and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(2), 509–518. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5396-6>
- Rosenbaum, M. A. & Henrich, A. W. (2014). Engineering microbial electrocatalysis for chemical and fuel production. *Current Opinion in Biotechnology*, 29, 93–98. Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2014.03.003>
- Rosenbaum, M., Aulenta, F., Villano, M. & Angenent, L. T. (2011). Cathodes as electron donors for microbial metabolism: Which extracellular electron transfer mechanisms are involved? *Bioresource Technology*, 102(1), 324–333. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2010.07.008>
- Ross, D. E., Flynn, J. M., Baron, D. B., Gralnick, J. A. & Bond, D. R. (2011). Towards Electrosynthesis in *Shewanella*: Energetics of Reversing the Mtr Pathway for Reductive Metabolism. (S. Xu, Hrsg.) *PLoS ONE*, 6(2), e16649. Public Library of Science. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016649>
- Ross, D. E., Ruebush, S. S., Brantley, S. L., Hartshorne, R. S., Clarke, T. A., Richardson, D. J. *et al.* (2007). Characterization of protein-protein interactions involved in iron reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(18), 5797–5808. <https://doi.org/10.1128/AEM.00146-07>
- Rowe, A. R., Rajeev, P., Jain, A., Pirbadian, S., Okamoto, A., Gralnick, J. A. *et al.* (2018). Tracking electron uptake from a cathode into *Shewanella* cells: Implications for energy acquisition from solid-substrate electron donors. *mBio*, 9(1), e02203-17. American Society for Microbiology (ASM). <https://doi.org/10.1128/mBio.02203-17>
- Roy, A. B. (1958). A new species of *Azotobacter* producing heavy slime and acid. *Nature*, 182(4628), 120–121. <https://doi.org/10.1038/182120a0>
- Rozendal, R. A., Leone, E., Keller, J. & Rabaey, K. (2009). Efficient hydrogen peroxide generation from organic matter in a bioelectrochemical system. *Electrochemistry Communications*, 11(9), 1752–1755. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2009.07.008>
- Sadhukhan, J., Lloyd, J. R., Scott, K., Premier, G. C., Yu, E. H., Curtis, T. *et al.* (2016, April). A critical review of integration analysis of microbial electrosynthesis (MES) systems with waste biorefineries for the production of biofuel and chemical from reuse of CO₂. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.11.015>
- Santoro, C., Arbizzani, C., Erable, B. & Ieropoulos, I. (2017). Microbial fuel cells: From fundamentals to applications. A review. *Journal of power sources*, 356, 225–244. Elsevier.

- <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2017.03.109>
- Sato, K., Kawaguchi, H. & Kobayashi, H. (2013). Bio-electrochemical conversion of carbon dioxide to methane in geological storage reservoirs. *Energy Conversion and Management*, 66, 343–350. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2012.12.008>
- Schlögl, Robert, Abanades, C., Aresta, M., Azapagic, A., Blekkan, E. A., Cantat, T. *et al.* (2018). *Novel carbon capture and utilisation technologies: Research and climate aspects.* (M. Mazotti & R. Schlögl, Hrsg.). Berlin: SAPEA. <https://doi.org/DOI.10.26356/CARBONCAPTURE>
- Schröder, U. (2012). Microbial fuel cells and microbial electrochemistry: into the next century! *ChemSusChem*, 5(6), 959. WILEY-VCH Verlag Weinheim.
- Schröder, U., Harnisch, F. & Angenent, L. T. (2015). Microbial electrochemistry and technology: terminology and classification. *Energy & Environmental Science*, 8(2), 513–519. The Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/C4EE03359K>
- Schuchmann, K. & Müller, V. (2014). Autotrophy at the thermodynamic limit of life: a model for energy conservation in acetogenic bacteria. *Nature reviews. Microbiology*, 12(12), 809–821. England. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3365>
- Schuetz, B., Schicklberger, M., Kuermann, J., Spormann, A. M. & Gescher, J. (2009). Periplasmic electron transfer via the c-type cytochromes Mtra and Fcca of *Shewanella oneidensis* Mr-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(24), 7789–7796. <https://doi.org/10.1128/AEM.01834-09>
- Schwalb, C., Chapman, S. K. & Reid, G. A. (2003). The tetraheme cytochrome CymA is required for anaerobic respiration with dimethyl sulfoxide and nitrite in *Shewanella oneidensis*. *Biochemistry*, 42(31), 9491–9497. <https://doi.org/10.1021/bi0344456f>
- Schwander, T., von Borzyskowski, L. S., Burgener, S., Cortina, N. S. & Erb, T. J. (2016). A synthetic pathway for the fixation of carbon dioxide in vitro. *Science*, 354(6314), 900–904. American Association for the Advancement of Science.
- Sen, K. Y., Hussin, M. H. & Baidurah, S. (2019). Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) by *Cupriavidus necator* from various pretreated molasses as carbon source. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, 51–59. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.11.006>
- Shi, L., Dong, H., Reguera, G., Beyenal, H., Lu, A., Liu, J. *et al.* (2016, Oktober 1). Extracellular electron transfer mechanisms between microorganisms and minerals. *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.93>
- Shrestha, N., Chilkoor, G., Vemuri, B., Rathinam, N., Sani, R. K. & Gadhamshetty, V. (2018). Extremophiles for microbial-electrochemistry applications: A critical review. *Bioresource Technology*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.151>
- Simakov, D. S. A. (Hrsg.). (2017). Biological Conversion of CO₂. *Renewable and Synthetic Fuels and Chemicals from Carbon Dioxide* (1. Aufl.). Cham: Springer. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-319-61112-9_4
- Simon, J. & Kern, M. (2008). Quinone-reactive proteins devoid of haem b form widespread membrane-bound electron transport modules in bacterial respiration. *Biochemical*

- Society Transactions* (Band 36, S. 1011–1016). <https://doi.org/10.1042/BST0361011>
- Simonte, F., Sturm, G., Gescher, J. & Sturm-Richter, K. (2017). Extracellular electron transfer and biosensors. *Bioelectrosynthesis* (S. 15–38). Springer.
- Stahl, A. D. & Amann, R. (1991). Development and Application of Nucleic Acid Probes. In E. Stackebrandt & M. Goodfellow (Hrsg.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* (S. 205–248). New York: John Wiley and Sons.
- Staneck, J. L. & Roberts, G. D. (1974). Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. *Applied microbiology*, 28(2), 226–231.
- Steen, H. (Hrsg.). (2000). *Handbuch des Explosionsschutzes* (1. Aufl.). Weinheim: Wiley-Vch. <https://doi.org/10.1002/9783527624997>
- Sturm-Richter, K., Golitsch, F., Sturm, G., Kipf, E., Dittrich, A., Beblawy, S. et al. (2015). Unbalanced fermentation of glycerol in *Escherichia coli* via heterologous production of an electron transport chain and electrode interaction in microbial electrochemical cells. *Bioresource Technology*, 186, 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.116>
- Sturm, G., Richter, K., Doetsch, A., Heide, H., Louro, R. O. & Gescher, J. (2015). A dynamic periplasmic electron transfer network enables respiratory flexibility beyond a thermodynamic regulatory regime. *ISME Journal*, 9(8), 1802–1811. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.264>
- Sugio, T., Hisazumi, T., Kanao, T., Kamimura, K., Takeuchi, F. & Negishi, A. (2006). Existence of *aa3*-type ubiquinol oxidase as a terminal oxidase in sulfite oxidation of *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 70(7), 1584–1591. <https://doi.org/10.1271/bbb.50623>
- Summers, Z. M., Gralnick, J. a & Bond, D. R. (2013). Cultivation of an Obligate Fe(II)-Oxidizing Lithoautotrophic Bacterium Using Electrodes. *mBio*, 4(1), 1–5. <https://doi.org/10.1128/mBio.00420-12.Editor>
- Sydow, A., Krieg, T., Mayer, F., Schrader, J. & Holtmann, D. (2014). Electroactive bacteria—molecular mechanisms and genetic tools. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6005-z>
- Sydow, A., Krieg, T., Ulber, R. & Holtmann, D. (2017). Growth medium and electrolyte—How to combine the different requirements on the reaction solution in bioelectrochemical systems using *Cupriavidus necator*. *Engineering in Life Sciences*, 17(7), 781–791. Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/elsc.201600252>
- Tanaka, K. & Ishizaki, A. (1994). Production of poly-d-3-hydroxybutyric acid from carbon dioxide by a two-stage culture method employing *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697T. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 77(4), 425–427. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(94\)90017-5](https://doi.org/10.1016/0922-338X(94)90017-5)
- Tanaka, K., Ishizaki, A., Kanamaru, T. & Kawano, T. (1995). Production of poly(D-3-hydroxybutyrate) from CO₂, H₂, and O₂ by high cell density autotrophic cultivation of *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 45(3), 268–275. <https://doi.org/10.1002/bit.260450312>
- Thakur, I. S., Kumar, M., Varjani, S. J., Wu, Y., Gnansounou, E. & Ravindran, S. (2018).

- Sequestration and utilization of carbon dioxide by chemical and biological methods for biofuels and biomaterials by chemoautotrophs: Opportunities and challenges. *Bioresource Technology*, 256, 478–490. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2018.02.039>
- Tian, J.-H., Lacroix, R., Quéméner, E. D.-L., Bureau, C., Midoux, C. & Bouchez, T. (2019). Upscaling of Microbial Electrolysis Cell Integrating Microbial Electrosynthesis: Insights, Challenges and Perspectives. *bioRxiv*. Cold Spring Harbor Laboratory. <https://doi.org/10.1101/609909>
- Tindall, B. J. (1990). Lipid composition of *Halobacterium lacusprofundi*. *FEMS Microbiology Letters*, 66(1–3), 199–202. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(90\)90282-U](https://doi.org/10.1016/0378-1097(90)90282-U)
- Tindall, B. J., Sikorski, J., Smibert, R. A. & Krieg, N. R. (2007). Phenotypic Characterization and the Principles of Comparative Systematics. *Methods for General and Molecular Microbiology, Third Edition* (S. 330–393). <https://doi.org/10.1128/9781555817497>
- Ueki, T., Nevin, K. P., Woodard, T. L., Aklujkar, M. A., Holmes, D. E. & Lovley, D. R. (2018). Construction of a *Geobacter* strain with exceptional growth on cathodes. *Frontiers in Microbiology*, 9(JUL). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01512>
- Ulber, R. & Soye, K. (2004). 5000 Jahre Biotechnologie: Vom Wein zum Penicillin. *Chemie in unserer Zeit*, 38(3), 172–180. Wiley Online Library.
- United Nations Treaty Collection. (2019). *Paris Agreement*. Zugriff am 8.8.2019. Verfügbar unter: https://treaties.un.org/pages/ViewDetails.aspx?src=TREATY&mtsg_no=XXVII-7-d&chapter=27&clang=_en
- Vassilev, I., Hernandez, P. A., Batlle-Vilanova, P., Freguia, S., Krömer, J. O., Keller, J. *et al.* (2018). Microbial Electrosynthesis of Isobutyric, Butyric, Caproic Acids, and Corresponding Alcohols from Carbon Dioxide. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 6(7). <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b00739>
- Venzlaff, H., Enning, D., Srinivasan, J., Mayrhofer, K. J. J., Hassel, A. W., Widdel, F. *et al.* (2013). Accelerated cathodic reaction in microbial corrosion of iron due to direct electron uptake by sulfate-reducing bacteria. *Corrosion Science*, 66, 88–96. Elsevier.
- Vollmer, W. & Seligman, S. J. (2010). Architecture of peptidoglycan: more data and more models. *Trends in Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.12.004>
- De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A. *et al.* (2009). *Systematic Bacteriology*. (M. Goodfellow, P. Kämpfer, H.-J. Busse, M.E. Trujillo, K. Suzuki, W. Ludwig *et al.*, Hrsg.) *Systematic Bacteriology* (Band 3). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-68489-5>
- Wang, D., Xu, A., Elmerich, C. & Ma, L. Z. (2017). Biofilm formation enables free-living nitrogen-fixing rhizobacteria to fix nitrogen under aerobic conditions. *ISME Journal*, 11(7), 1602–1613. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.30>
- Wang, D., Zhao, J., Song, H. & Chou, L. (2011). Characterization and performance of Cu/ZnO/Al₂O₃ catalysts prepared via decomposition of M (Cu, Zn)-ammonia complexes under sub-atmospheric pressure for methanol synthesis from H₂ and CO₂. *Journal of Natural Gas Chemistry*, 20(6), 629–634. Elsevier.

- Wang, F., Gu, Y., O'Brien, J. P., Yi, S. M., Yalcin, S. E., Srikanth, V. *et al.* (2019). Structure of Microbial Nanowires Reveals Stacked Hemes that Transport Electrons over Micrometers. *Cell*, 177(2), 361-369.e10. Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.03.029>
- Wang, Z., Leary, D. H., Malanoski, A. P., Li, R. W., Hervey, W. J., Eddie, B. J. *et al.* (2015). A previously uncharacterized, nonphotosynthetic member of the *Chromatiaceae* is the primary CO₂-fixing constituent in a self-regenerating biocathode. *Applied and environmental microbiology*, 81(2), 699–712. American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/AEM.02947-14>
- Watanabe, K., Manefield, M., Lee, M. & Kouzuma, A. (2009, Dezember). Electron shuttles in biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.09.006>
- Weber, K. A., Achenbach, L. A. & Coates, J. D. (2006, Oktober). Microorganisms pumping iron: Anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1490>
- Wilhelm, C. (2016). *Katalytische Hydrierung von Kohlendioxid an Metall-Träger-Katalysatoren in der Gasphase*. (Dissertation). Technische Universität Kaiserslautern, Fachbereich Chemie.
- Willems, A., Busse, J., Goor, M., Pot, B., Falsen, E., Jantzen, E. *et al.* (1989). *Hydrogenophaga*, a New Genus of Hydrogen-Oxidizing Bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39(3), 319–333. <https://doi.org/10.1099/00207713-39-3-319>
- Xu, D., Li, Y., Song, F. & Gu, T. (2013). Laboratory investigation of microbiologically influenced corrosion of C1018 carbon steel by nitrate reducing bacterium *Bacillus licheniformis*. *Corrosion Science*, 77, 385–390. <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2013.07.044>
- Xu, S., Jangir, Y. & El-Naggar, M. Y. (2016). Disentangling the roles of free and cytochrome-bound flavins in extracellular electron transport from *Shewanella oneidensis* MR-1. *Electrochimica Acta*, 198, 49–55. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2016.03.074>
- Yates, M. D., Siegert, M. & Logan, B. E. (2014). Hydrogen evolution catalyzed by viable and non-viable cells on biocathodes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(30), 16841–16851. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.08.015>
- Yu, L., Yuan, Y., Tang, J. & Zhou, S. (2017). Thermophilic *Moorella thermoautotrophica*-immobilized cathode enhanced microbial electrosynthesis of acetate and formate from CO₂. *Bioelectrochemistry*, 117, 23–28. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/J.BIOELECTCHEM.2017.05.001>
- Zhang, T., Nie, H., Bain, T. S., Lu, H., Cui, M., Snoeyenbos-West, O. L. *et al.* (2013). Improved cathode materials for microbial electrosynthesis. *Energy and Environmental Science*, 6(1), 217–224. <https://doi.org/10.1039/c2ee23350a>

VI. APPENDIX

6.1 16S rDNA Sequenz *Pseudomonas*-Isolat

GAAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAATGGAGCTTGCTCCATGATTCAGCGGC
 GGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACTGCTACGGGAGAAAGTGG
 GGGATCTTCGGACCTCAGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGCGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTG
 AGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATC
 CAGCCATGCCCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTAC
 CGACAGAATAAGCACCGGCTAATTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTA
 GGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAAGTGGCGAGCTAGAGTATGGCAGAGGGTGGTGGAAAT
 TCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGGCTAATACTGACACTGAGGTGCGAAAAGCGTG
 GGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGCTAGTCCACGCCGTAACAGATGTGCTAGCAGCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCA
 TTAAGTCGACCGCCTGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA
 AGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGCTTGACATGCTGAGAAGTCCAGAGATGGCGGGTGCCTTCGGGAAGTACAGACAGGTGCTGCATGGC
 TGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGA
 GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACA
 AAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCT
 AGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTA
 GTCTAACCTTCGGGGGACGGTTACCACGGAGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGATCAC
 TC

6.2 16S rDNA Sequenz *Hydrogenophaga*-Isolat

AAAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCTTTACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGCCGAAGGTGCTGACGAGTGGCGA
 ACGGGTGAGTAATGCATCGGAACGTGCCAGTCTGGGGGATAACGCAGCGAAAGCTGTGCTAATACCGCATACTGATGATGAAAGCGGGG
 GACCGTAAGGCCTCGCGGATTGGAGCGGCCGATGTCAGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGCCAACGATCTGTAGCTGGTCTGA
 GAGGACGACCAGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCC
 AGCAATGCCGCTGCAGGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAACACTGCTTTTGTACGGAACGAAACGGTCTGGGTTAATACCTGGACTAATGACGGTAC
 CGTAAGAATAAGCACCGGCTAATACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGC
 GCGGTTTTGTAAGACAGGCGTAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCGCTTGACTGCAAGGCTGGAGTGCAGAGGGGGATGGAATT
 CCGCGTGTAGCAGTGAATGCGTAGATATGCGGAGGAACCGGATGGCGAAGGCAATCCCCTGGGCTGCACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTG
 GGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGCTAGTCCACGCCCTAACAGATGTCAACTGGTGTGGGAATTTACTTTCTCAGTAACGAAGCTAACCGT
 GAAGTTGACCGCCTGGGAGTACGGCCGAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGACAAGCGGTGGATGATGTGGTTAATTCGAT
 GCAACGCGAAAAACCTTACCCACCTTTGACATGGCAGGAAGTTCCAGAGATGGATTCTGTGCTCGAAAGAGAACCTGCACACAGGTGCTGCATGG
 CTGTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGCCATTAGTTGCTACGAAAGGGCACTCTAATGGGACTG
 CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATAGGTGGGGCTACACACGTCATAAATGGCCGGTACAAAGGG
 CAGCCAACCCGCAAGGGGAGCCAATCCATAAAGCCGGTCTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAA
 TCGTGGATCAGCATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGCGGGTCTCGCCAGAAGTAGTTAGCCTA
 ACCGCAAGGAGGGCGATTACCACGGCGGGGTTCTGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTC

6.3 Dünnschichtchromatographien zur Bestimmung der polaren Lipide von *K. tusciae* und *K. spormannii*

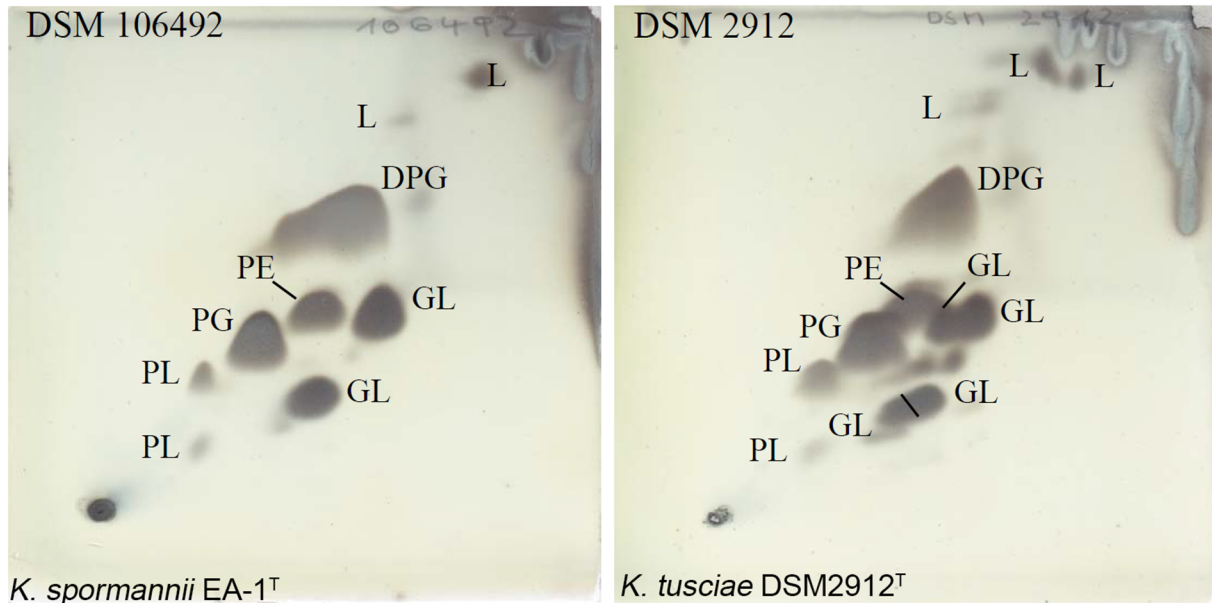


Abb. 34: 2D-Dünnschichtchromatographien der extrahierten polaren Lipide aus *K. spormannii* und *K. tusciae*. L, Lipid; GL, Glycolipid; PL, Phospholipid; PG, Phosphatidylglycerol; PE, Phosphatidylethanolamin; DPG, Diphosphatidylglycerol.

6.4 Vergleich der Fettsäureprofile von *K. spormannii* und *K. tusciae*

Tab. 43: Fettsäureprofile von *K. spormannii* und *K. tusciae*. Werte sind in Prozent angegeben. Als "summed feature" wurden Fettsäuren zusammengefasst, welche mit Hilfe des MIS-Systems nicht in distinkte Peaks aufgetrennt werden konnten: Summed feature 3 enthält die Fettsäuren C_{16:1ω7c} und/oder C_{16:1ω6c}, summed feature 4 besteht aus iso-C_{17:11} und/oder anteiso-C_{17:1B} Säuren und summed feature 9 enthält die Fettsäuren iso-C_{17:1ω9c} oder C_{16:0 10-methyl}.

Fettsäure	<i>K. spormannii</i> EA-1 ^T		<i>K. tusciae</i> DSM2912 ^T	
	TSBA6	TSBA40	TSBA6	TSBA40
anteiso-C _{11:0}	-	-	0,1	0,1
iso-C _{14:0}	-	-	0,2	0,2
C _{14:0}	-	-	0,1	0,1
iso-C _{15:0}	4,3	4,3	2,4	2,4
anteiso-C _{15:0}	5,8	5,8	2,3	2,3
C _{15:0}	-	0,3	-	0,3

iso-C_{16:1} H	-	-	0,5	0,5
iso-C_{16:0}	13,3	13,2	36,5	36,4
C_{16:0}	1,2	1,2	3,1	3,1
anteiso-C_{17:1} ω9c	-	-	0,4	-
iso-C_{17:1} ω9c	-	-	-	0,2
iso-C_{17:0}	23,0	23,0	18,7	18,7
anteiso-C_{17:0}	50,0	49,9	26,8	26,7
C_{17:0}	0,4	0,4	0,6	0,6
iso-C_{18:0}	1,3	1,3	5,7	5,7
iso-C_{18:1} H	-	-	0,8	0,8
C_{18:1} ω9c	-	-	0,1	0,1
C_{18:0}	0,2	0,2	0,7	0,7
anteiso-C_{19:0}	0,5	0,5	0,5	0,5
summed feature 3	-	-	0,2	0,2
summed feature 4	-	-	0,3	0,3
summed feature 9	-	-	0,2	-

6.5 Vergleichende Genomanalyse (*K. tusciae* vs. *K. spormannii*)

Tab. 44: Tabellarische Auflistung der in der vergleichenden Genomanalyse gefundenen Gene.

Proteinannotierung (Genname)	1	2	% identity
Glykolyse			
Zuckerkinase / Glukokinase	CVV65_12065	Btus_2420	89,2
Phosphoglukomutase	CVV65_01945	Btus_1356	84,9
Glukose-6-Phosphat-Isomerase	CVV65_06905	Btus_1909	95,7
6-Phosphofruktokinase (<i>pfkA</i>)	CVV65_12120	Btus_2431	97,2
Fruktose-Bisphosphat-Aldolase (<i>fba</i>)	CVV65_14335	Btus_3269	98,3
	CVV65_16185	Btus_3269	99,3
Triosephosphat-Isomerase	CVV65_02615	Btus_2141	94,3

Glyceraldehyde-3-Phosphat-Dehydrogenase (<i>gap</i>)	CVV65_02605	Btus_1896	97,4
	CVV65_06970	Btus_2143	97,7
	CVV65_14345	Btus_2863	98,8
Phosphoglycerate-Kinase (<i>pgk</i>)	CVV65_02610	Btus_2142	98,0
	CVV65_14325	Btus_2865	93,9
2,3-Bisphosphoglycerat-unabhängige Phosphoglycerat-Mutase	CVV65_02620	Btus_0713	96,3
	CVV65_05010	Btus_2140	94,2
Phosphopyruvat-Hydratase	CVV65_02625	Btus_2139	99,3
Pyruvatkinase (<i>pyk</i>)	CVV65_12115	Btus_2430	98,5
<u>Pentosephosphat-Weg – nicht oxidativer Teil</u>			
Ribose5-Phosphat-Isomerase B	CVV65_14385	Btus_2877	98,1
	CVV65_16035	Btus_3246	96,9
Ribulose-Phosphate3-Epimerase	CVV65_09260	Btus_1428	98,6
Transketolase	CVV65_13245	Btus_2647	93,0
	CVV65_14375	Btus_2875	95,3
Fruktose-6-Phosphat-Aldolase	CVV65_16180	Btus_3268	94,4
Fructose-Bisphosphat-Aldolase	CVV65_14335	Btus_3269	98,3
	CVV65_16185	Btus_3269	99,3
<u>Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (PDC)</u>			
Pyruvat-Dehydrogenase E1 Komponente Alpha-Untereinheit	CVV65_03055	Btus_0310	97,5
	CVV65_04505	Btus_0615	96,1
	CVV65_08525	Btus_1583	98,6
Pyruvat-Dehydrogenase E1 Komponente Beta-Untereinheit	CVV65_03060	Btus_0311	99,7
	CVV65_04510	Btus_0616	97,5
	CVV65_08520	Btus_1584	95,4
Pyruvat-Dehydrogenase E2 Komponente (Dihydrolipoamid-Acetyltransferase)	CVV65_03065	Btus_0312	87,9
	CVV65_04515	Btus_0617	95,9
	CVV65_10285	-	-
	CVV65_11910	Btus_2387	97,1
Dihydrolipoamide-Dehydrogenase	CVV65_03070	Btus_0313	98,3
<u>Citratzyklus</u>			

	CVV65_05935	-	-
Citrat-Synthase	CVV65_11825	Btus_2368	97,9
	CVV65_11970	Btus_2400	98,4
Aconitat-Hydratase (<i>acnA</i>)	CVV65_12615	Btus_2539	98,7
Isocitrat-Dehydrogenase	CVV65_12110	Btus_2429	99,6
2-Oxoglutarat-Dehydrogenase	CVV65_09410	Btus_1382	-
	CVV65_09415	Btus_1381	-
Succinyl-CoA-Synthetase	CVV65_08970	Btus_1482	99,0
	CVV65_08975	Btus_1483	99,7
Succinat-Dehydrogenase / Fumarat-Reductase	CVV65_04625	Btus_0635	99,5
	CVV65_04630	Btus_0636	99,7
	CVV65_04635	Btus_0637	97,6
Fumarat-Hydratase	CVV65_04020	Btus_0510	98,5
	CVV65_13105	Btus_2615	98,4
Malat-Dehydrogenase (<i>mdh</i>)	CVV65_12105	Btus_2428	98,4
	CVV65_12955	-	-
Transporter			
C4-Dicarboxylat ABC Transporter	CVV65_01010	-	-
3-Phosphoglycerol ABC Transporter Permease	CVV65_02795	Btus_1053	97,8
Zucker ABC Transporter Permease	CVV65_02800	Btus_2095	93,9
ABC Transporter 3-Phosphoglycerol-binding protein	CVV65_02810	Btus_2093	96,7
Zucker ABC Transporter substrate-binding protein	CVV65_06575	Btus_1411	96,4
Zucker ABC Transporter ATP-binding protein	CVV65_09345	Btus_1956	96,3
Zucker ABC Transportsystem Permease	CVV65_09420	-	-
Zucker ABC Transporter ATP-binding protein	CVV65_09425	-	-
Zucker ABC Transporter substrate-binding protein	CVV65_09430	Btus_2096	62,5
Multipl. Zucker Transportsystem ATP-binding protein	CVV65_11890	-	-
Zucker ABC Transporter ATP-binding protein	CVV65_13975	-	-
Atmungskette			
Protohäm-IX-Farnesyltransferase (<i>cyoE</i>)	CVV65_03165	Btus_0331	96,5

Cytochrome-c-Oxidase Subunit IV (<i>coxD</i>)	CVV65_03705	Btus_0435	95,2
Cytochrome-c-Oxidase Subunit III (<i>coxC</i>)	CVV65_03700	Btus_0434	96,2
	CVV65_00145	Btus_0027	95,0
Cytochrome-c-Oxidase Subunit I (<i>coxB</i>)	CVV65_03660	Btus_0462	96,9
	CVV65_03695	Btus_0433	97,9
	CVV65_00150	Btus_0028	96,8
Cytochrome-c-Oxidase Subunit II (<i>coxA</i>)	CVV65_03655	Btus_0425	98,7
	CVV65_03690	Btus_0432	95,3
Cytochrom- <i>o</i> -Menachinol-Oxidase Subunit IV (<i>cyoD</i>)	CVV65_10435	-	-
Cytochrom- <i>o</i> -Menachinol-Oxidase Subunit III	CVV65_10440	-	-
Cytochrom- <i>aa3</i> -Menachinol-Oxidase Subunit I (<i>qoxB</i>)	CVV65_10445	-	-
Cytochrom- <i>aa3</i> -Menachinol-Oxidase Subunit II (<i>qoxA</i>)	CVV65_10450	-	-
<u>Stickstoffmetabolismus</u>			
Nitrat-/Nitrittransporter (<i>nrt</i>)	-	Btus_1164	-
	-	Btus_1658	-
	-	Btus_1652	-
Respiratorische Nitratreduktase (<i>narGHI</i>)	-	Btus_1654	-
	-	Btus_1655	-
	-	Btus_1161	-
Nitritreduktase (<i>nirBD</i>)	-	Btus_1162	-
	CVV65_08110	-	-
Nitrogenase (<i>nifDKH</i>)	CVV65_08115	-	-
	CVV65_08120	-	-
	CVV65_02375	Btus_2189	62,5
Urease accessory proteins (<i>ureDGF</i>)	CVV65_02380	Btus_2190	94,2
	CVV65_02385	Btus_2191	65,8
Urease Subunit Alpha	CVV65_02370	Btus_2192	83,6
Urease Subunit Gamma	CVV65_02365	Btus_2193	91,0
<u>Schwefelmetabolismus</u>			
Sulfateadenyltransferase	CVV65_00995	Btus_0195	97,2
Bifunktionale Oligoribonuklease and PAP Phosphatase (<i>nrnA</i>)	-	Btus_1543	-

Phosphoadenosin-Phosphosulfat-Reduktase	CVV65_00985	Btus_0193	98,7
Sulfit-Reduktase	CVV65_10470	Btus_1135	99,8
Thiosulfat/3-Mercaptopyruvat-Sulfurtransferase	CVV65_12275	Btus_2456	95,8
Lithoautotrophes Wachstum (Schlüsselenzyme)			
[NiFe]-Hydrogenase große Untereinheit	CVV65_06670	Btus_2045	41,1
[NiFe]-Hydrogenase kleine Untereinheit	CVV65_06665	Btus_2044	57,1
Phosphoribulokinase	CVV65_14340	Btus_2868	99,4
Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase große Untereinheit	CVV65_14355	Btus_2871	99,4
Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase kleine Untereinheit	CVV65_14360	Btus_2872	100

6.6 Phylogenetische Untersuchungen zur [NiFe]-Hydrogenase aus *K. spormannii*

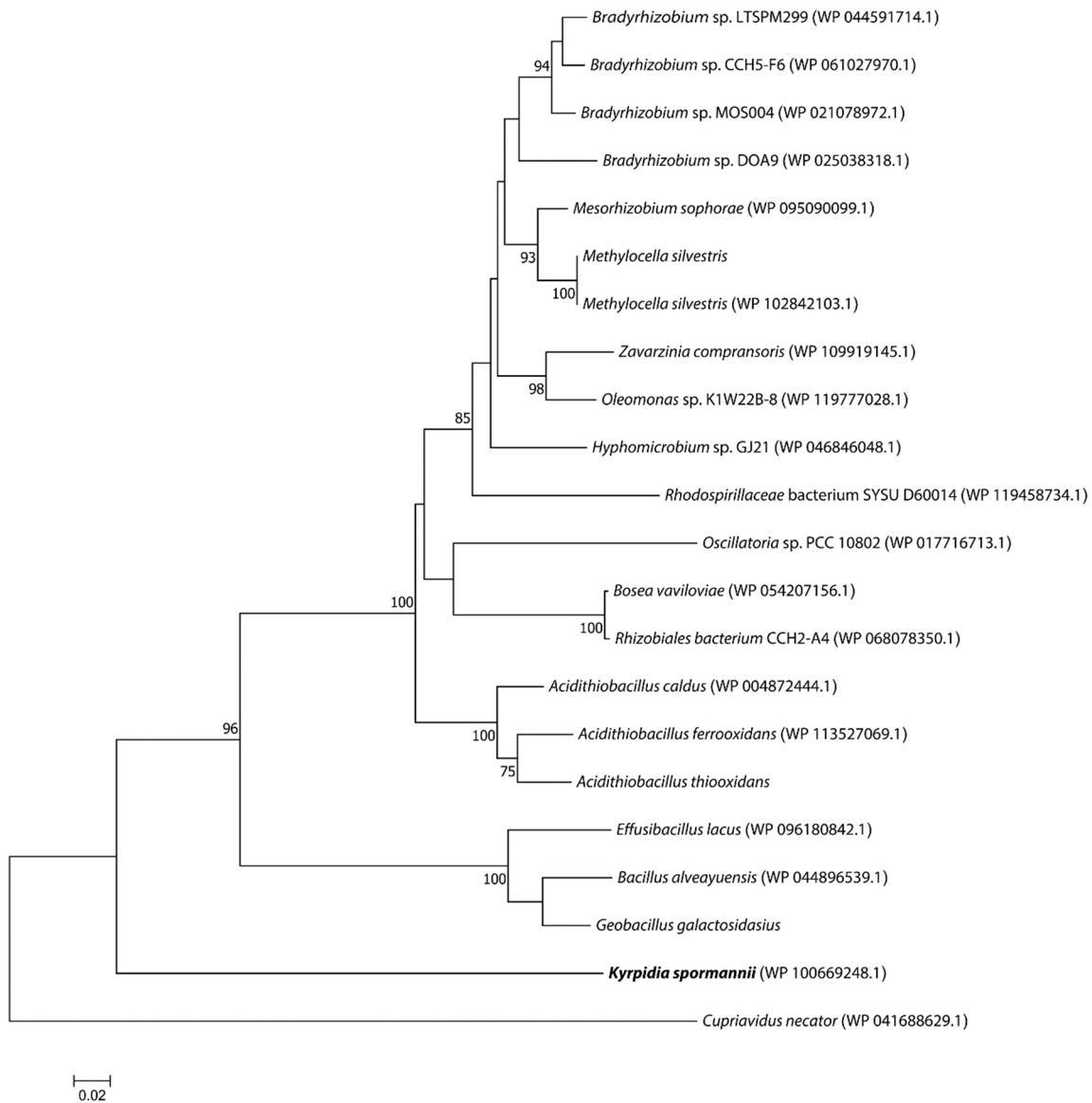


Abb. 35: Phylogenetischer Stammbaum, basierend auf der Proteinsequenz der kleinen Untereinheit der [NiFe]-Hydrogenase. Zunächst wurde eine BlastP-Suche anhand der Sequenz aus *K. spormannii* durchgeführt. Die Sequenzen der 20 ähnlichsten Hydrogenase-Untereinheiten (basierend auf dem e-Value) wurden zur Berechnung des Stammbaumes herangezogen. Bootstrapwerte über 70 % sind an den entsprechenden Knotenpunkten angegeben. Die Länge des Maßstabs entspricht 0,02 Substitutionen pro Aminosäure. Die Hydrogenasesequenz von *Cupriavidus necator* wurde als Outgroup gewählt.

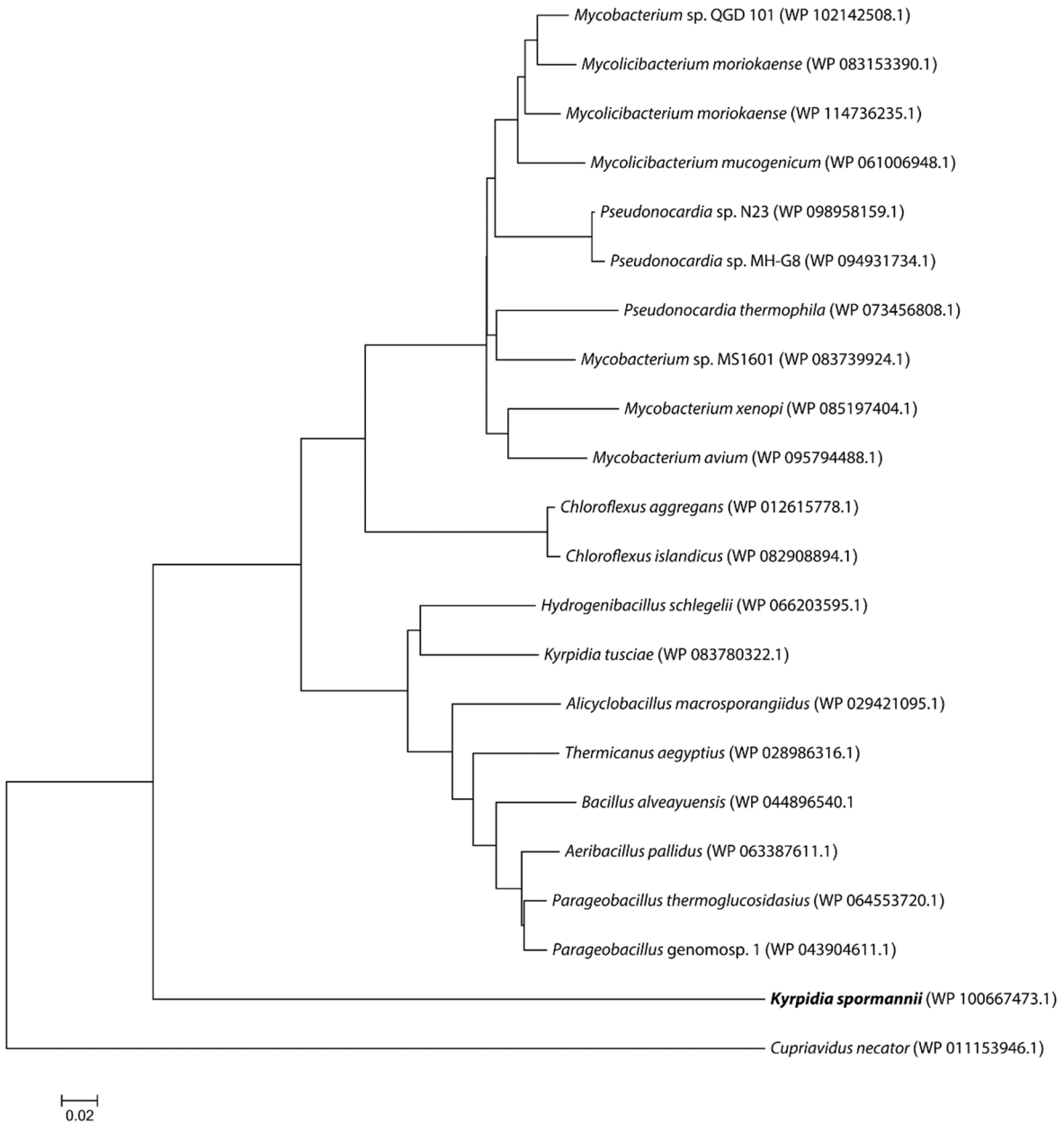


Abb. 36: Phylogenetischer Stammbaum, basierend auf der Proteinsequenz der großen Untereinheit der [NiFe]-Hydrogenase. Zunächst wurde eine BlastP-Suche anhand der Sequenz aus *K. spormannii* durchgeführt. Die Sequenzen der 20 ähnlichsten Hydrogenase-Untereinheiten (basierend auf dem e-Value) wurden zur Berechnung des Stammbaumes herangezogen. Bootstrapwerte über 70 % sind an den entsprechenden Knotenpunkten angegeben. Die Länge des Maßstabs entspricht 0,02 Substitutionen pro Aminosäure. Die Hydrogenasesequenz von *Cupriavidus necator* wurde als Outgroup gewählt.

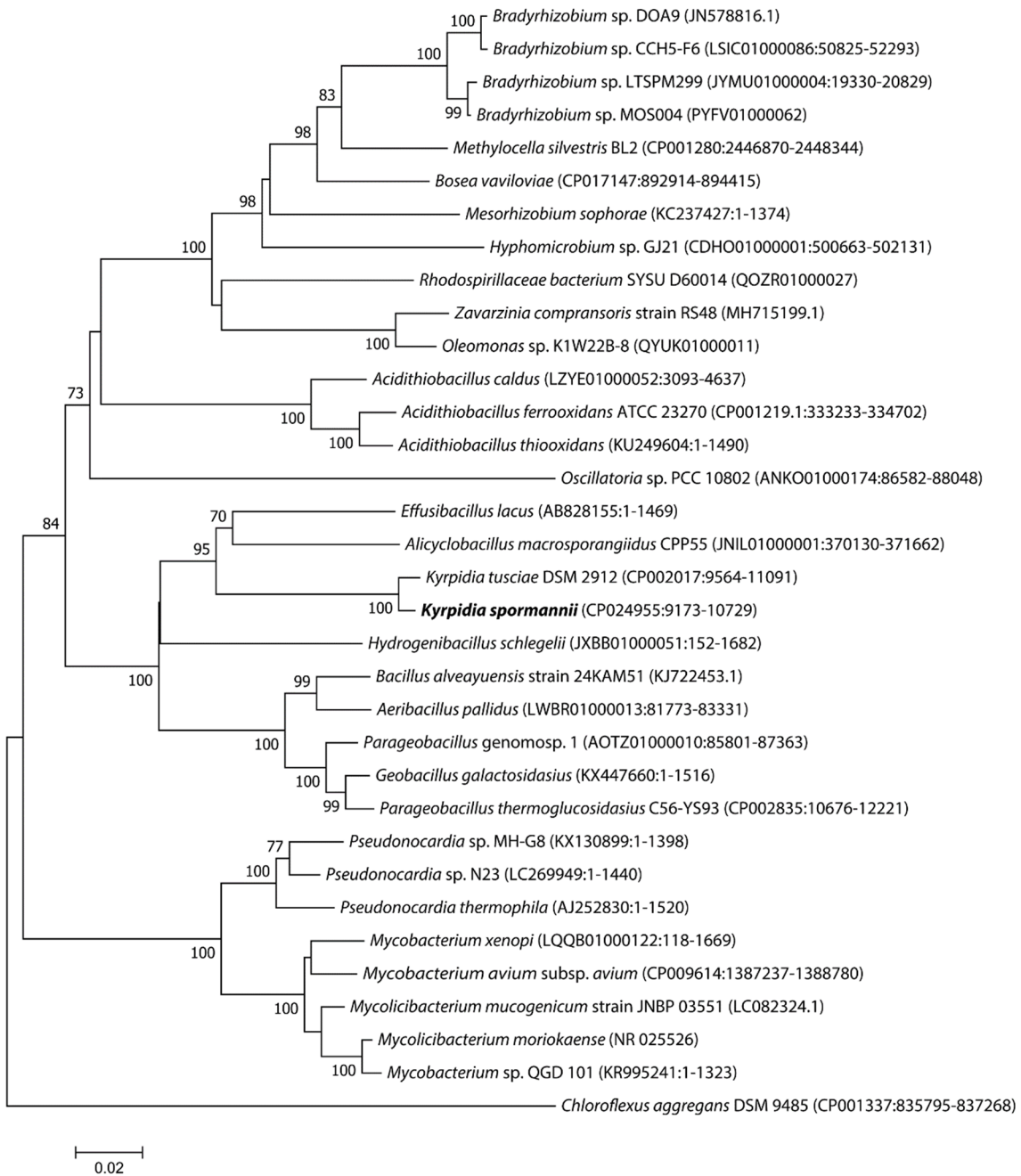


Abb. 37: Phylogenetischer Stammbaum, basierend auf den 16S rRNA-Genen der Spezies, dessen Hydrogenase-Untereinheiten die höchste Ähnlichkeit zu den Hydrogenase-Untereinheiten aus *K. spormannii* aufweisen (siehe Abb. 35 und Abb. 36). Bootstrapwerte über 70 % sind an den entsprechenden Knotenpunkten angegeben. Die Länge des Maßstabs entspricht 0,02 Substitutionen pro Nukleotid.

6.7 Absolute Expressionswerte (tpm) des zentralen Kohlenstoffmetabolismus von *K. spormannii*

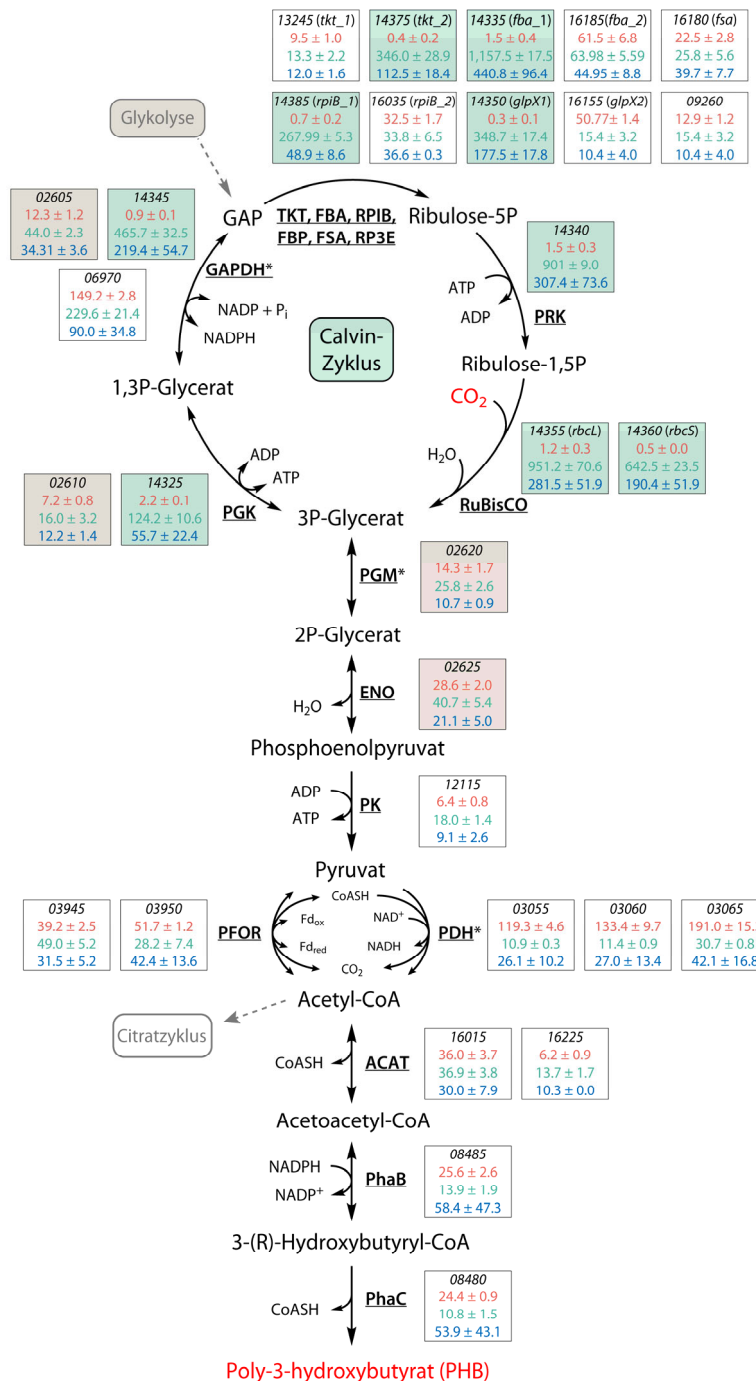


Abb. 38: Modell des Kohlenstoffflusses von CO₂ zu PHB in *K. spormannii*. Die Gennummern sowie deren absolute sind reaktionszugehörig dargestellt (rot: Heterotroph, Grün: Lithoautotroph, Blau: Elektroautotroph). Zusätzliche Genkopien beteiligter Enzyme mit vernachlässigbarer Expression sind nicht aufgeführt (Betroffene Enzyme sind mit einem Sternchen markiert). TKT – Transketolase; FBP – Fructose-1,6-Bisphosphatase; FSA – Fructose-6-Phosphat-Aldolase; FBA – Fructose-1,6-Bisphosphatase-Aldolase; RPIB – Ribose-5-Phosphat-Isomerase; PRK – Phosphoribulokinase; RuBisCO – Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase; GAPDH – Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; PGM – Phosphoglycerat-Mutase; ENO – Enolase; PK – Pyruvatkinase; PDH – Pyruvatdehydrogenase; PFOR – Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase; ACAT – Acetyl-CoA-Acyltransferase; PhaB – Acetoacetyl-CoA-Reduktase; PhaC – PHB-Polymerase.

6.8 Absolute Expression der an der Atmungskette beteiligten Gene

Gennummer	Elektroautotroph	Autotroph	Heterotroph
CVV65_00145	10,7±0,4	13,1±0,1	6,1±0,3
CVV65_00150	10,6±2,4	4,5±0	1,6±0,5
CVV65_03510	103,9±70,2	49±5,3	33,3±6,8
CVV65_03515	122,8±89,4	40,9±5,8	31,8±7,4
CVV65_03655	170,7±109,6	298,4±16,4	102,2±23,8
CVV65_03660	192,1±129,3	190,2±25,3	84±20,8
CVV65_03690	52,3±0,8	209,4±18,6	47,3±7,1
CVV65_03695	51,0±4,8	180,1±22,4	41,4±2,9
CVV65_03700	51,7±1,3	110,5±17,6	30±3,1
CVV65_03705	35,1±1,7	80,7±11,8	21,3±3,4
CVV65_04220	6,0±1,0	3,9±0	6,9±0,7
CVV65_04225	3,1±0,2	0,9±0,1	1,1±0,3
CVV65_04625	19,5±7,6	43,9±3,5	43,8±2,4
CVV65_04630	19,5±8,1	66,5±3,1	82,6±12,3
CVV65_04635	23,8±8,1	42,2±7,7	47,5±5
CVV65_06665	419,1±37,7	339,5±16,9	20,1±2,7
CVV65_06670	323,4±40,3	259,8±15	15,2±2,4
CVV65_07930	128,4±58,1	355,4±16,5	134,3±13,8
CVV65_07935	114,3±76,0	390,1±54,4	128±9,8
CVV65_07940	115,8±69,8	470±4,3	156,9±0,3
CVV65_10435	40,3±3,2	27,8±2,9	10±3,6
CVV65_10440	15,7±9,6	18±4,6	8,5±3,3
CVV65_10445	15,3±9,8	39,2±4	12±3,1
CVV65_10450	20,4±11,0	57,1±6,5	18±0
CVV65_14370	163,5±16,4	501,1±64,5	0,5±0,3
CVV65_14380	81,0±0,6	249,5±18,1	0,3±0,1
CVV65_14390	65,0±9,4	267,7±15,3	0,4±0,2
CVV65_14395	60,7±5,9	220,1±10,4	0,2±0,2
CVV65_14400	54,0±18,6	213,3±26,8	0,2±0
CVV65_14405	66,6±2,7	239,7±10,3	0,5±0,1
CVV65_14410	37,1±5,6	130,3±14,3	0,6±0
CVV65_14415	34,6±0,7	128,1±10,2	0,3±0,1
CVV65_14420	21,5±1,5	61,5±7,8	0,1±0,1
CVV65_14425	32,7±1,1	128,1±9	0,2±0,2
CVV65_14430	22,7±0,0	55,9±7,8	0,3±0
CVV65_14435	23,1±0,7	72,1±9,2	0,3±0
CVV65_15910	12,2±2,4	17,7±3,1	17,6±1,4
CVV65_15915	10,9±3,7	14,6±1,6	11,3±0
CVV65_15920	9,6±3,8	19,9±1,4	12±1,1

CVV65_15925	11,8±6,0	19,5±5,9	9,8±1,8
CVV65_15930	6,6±2,9	23±2,8	18,4±2,1
CVV65_15935	9,5±4,5	18,2±1,4	12,9±0,9
CVV65_15940	9,1±4,2	22,8±3,4	15,4±0
CVV65_15945	14,5±5,0	38,1±1,8	28,2±2,8
CVV65_15950	19,4±2,7	30,8±3,3	26,7±0,9
CVV65_15955	21,3±3,4	25,2±1,4	17,1±0,9
CVV65_15960	34,2±5,9	29,8±2,6	19,7±1,3
CVV65_15965	48,7±25,4	57,5±3,1	42,2±4,4
CVV65_15970	49,0±30,0	82,6±10,4	53,7±12,2
CVV65_15975	39,3±21,6	95,7±7,5	64,9±15,6
CVV65_15980	42,3±18,7	105,6±4,6	54±12,4
CVV65_15985	42,4±19,0	99,3±12,9	43,5±10
CVV65_15990	46,4±14,4	129,7±8,9	60±11,7
CVV65_15995	26,6±13,7	34,1±3,1	15,3±0,6
CVV65_16000	65,9±40,5	151,2±21,5	65,7±7,4

6.9 Tabellarische Auflistung der c-Typ Cytochrome in *K. spormannii*

Tab. 45: Auflistung derjenigen Gene, in deren Aminosäuresequenz die c-Typ-Cytochrom-Erkennungssequenz CXXCH gefunden werden konnte.

Genname oder Nummer	PGAP-Annotation	Elektroautotroph vs. Lithoautotroph Log2FC	FDR p-Value	Absolute Expression (tpm)
coxB	<i>cytochrome c oxidase subunit II</i>	-1,72	4,63E-05	52,3±0,8
CVV65_00125	<i>IMP dehydrogenase</i>	1,01	1,63E-01	3,4±1,1
CVV65_00390	<i>DUF2757 domain-containing protein</i>	0,07	9,13E-01	34,1±6,3
CVV65_01325	<i>cytochrome C</i>	-0,32	5,81E-01	61,3±27,2
CVV65_01460	<i>pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase</i>	0,31	6,25E-01	2,9±0,9
CVV65_01905	<i>transposase</i>	0,49	2,32E-01	12,4±0,2
CVV65_03525	<i>thioredoxin domain-containing protein</i>	0,81	6,32E-02	16,5±3,9
CVV65_03775	<i>ribonucleoside-diphosphate reductase</i>	-3,18	5,59E-14	10,4±3
CVV65_04080	<i>hypothetical protein</i>	-0,54	3,53E-01	5,8±4,2
CVV65_04230	<i>cytochrome C</i>	2,26	1,55E-04	4±0,3
CVV65_04475	<i>transposase</i>	0,04	9,54E-01	20,7±6,9

CVV65_04760	<i>valine--tRNA ligase</i>	-1,33	2,56E-04	15,9±3,9
CVV65_05035	<i>AraC family transcriptional regulator</i>	0,3	4,39E-01	45,9±8,4
CVV65_05980	<i>IMP dehydrogenase</i>	0,06	9,24E-01	5,9±0,9
CVV65_06490	<i>hypothetical protein</i>	0,66	1,39E-01	20,4±0,6
CVV65_07435	<i>glutamate synthase</i>	-0,6	2,48E-01	49,2±16,1
CVV65_07940	<i>cytochrome c class I</i>	-1,86	4,15E-04	115,8±69,8
CVV65_08185	<i>cytochrome c class I</i>	-0,33	4,96E-01	137,4±63,3
CVV65_09780	<i>thiol-disulfide oxidoreductase</i>	-0,53	2,90E-01	1121,6±526,5
CVV65_10670	<i>alanine--tRNA ligase</i>	-0,87	6,16E-02	14,5±1,6
CVV65_11325	<i>hypothetical protein</i>	2,8	2,95E-03	7,8±3,5
CVV65_12370	<i>4Fe-4S ferredoxin</i>	1,24	7,81E-02	2,3±0,2
CVV65_12420	<i>ligase</i>	1,36	6,72E-03	11,6±1,9
CVV65_12465	<i>Fe-S oxidoreductase</i>	0,81	1,90E-01	2,7±0,7
CVV65_12665	<i>hypothetical protein</i>	-0,73	2,01E-01	10,6±4
CVV65_13415	<i>transposase</i>	0,59	1,66E-01	9,3±1
CVV65_13435	<i>hypothetical protein</i>	1,77	1,20E-04	10,6±5,9
CVV65_13600	<i>hypothetical protein</i>	-7,46	5,35E-02	0±0
CVV65_13820	<i>cytochrome C551</i>	-0,2	7,42E-01	198,9±118,9
CVV65_14585	<i>restriction endonuclease subunit S</i>	-1,11	2,27E-02	7±4,1
CVV65_15450	<i>type II secretion system protein GspE</i>	1,27	9,02E-03	33,2±17,6
CVV65_16135	<i>50S ribosomal protein L31</i>	0,64	9,62E-02	173,8±24,2
CVV65_16230	<i>hypothetical protein</i>	-0,5	2,15E-01	12,9±4,1
polC	<i>PolC-type DNA polymerase III</i>	-0,41	3,41E-01	10,4±4,4

6.10 BLAST-Ergebnisse - PplA aus *L. monocytogenes* gegen das Genom von *K. spormannii*

Gen#	Annotation	Query Cover	E value	Identity
CVV65_09105	<i>Penicillin-binding protein</i>	16 %	0,35	29,17 %
CVV65_10095	<i>Hypothetical protein</i>	16 %	0,36	29,17 %
CVV65_06665	<i>[NiFe]-Hydrogenase large subunit</i>	16 %	7,3	31,58 %

6.11 Chronoamperometrische Daten des ^{13}C -Inkorporations-experimentes

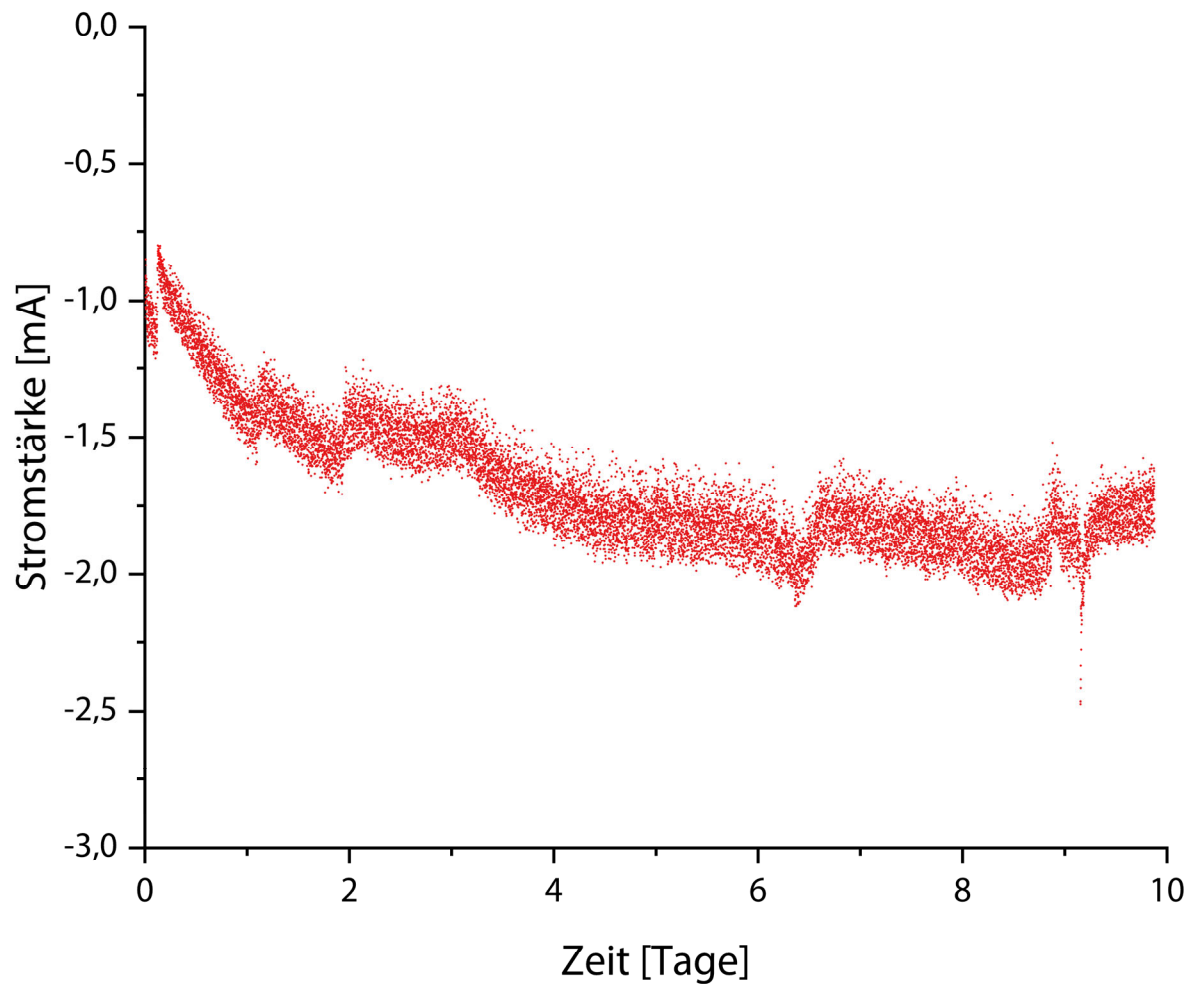


Abb. 39: Während der Fließzellkultivierung des ^{13}C -Inkorporationsexperimentes gemessene Stromstärke gegen die Zeit.