

Upcycling von Biomasse-Abfallströmen über biotechnologische Reaktionskaskaden

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

Daniel Härrer

1. Referent: Prof. Dr. Johannes Gescher
2. Referent: Prof. Dr. Harald Horn

Tag der mündlichen Prüfung: 26.07.2021



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

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die folgende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Alle Ausführungen, die anderen Schriften wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, sind von mir durch die Angabe der Quelle kenntlich gemacht. Diese Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Fassung noch nicht Bestandteil einer Prüfungsleistung. Weiterhin habe ich beim Anfertigen dieser Arbeit die Regeln zur Sicherung der guten wissenschaftlichen Praxis des KIT beobachtet und alle Primärdaten gemäß Abs. A (6) am Institut für Angewandte Biowissenschaften archiviert. Des Weiteren versichere ich, dass die elektronisch mit der schriftlichen Form dieser Arbeit übereinstimmen.

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Februar 2018 bis Juni 2021 am Institut für Angewandte Biowissenschaften der Fakultät für Chemie- und Biowissenschaften am Karlsruher Institut für Technologie unter der Leitung von Professor Johannes Gescher durchgeführt.

Karlsruhe den,

Daniel Härrer

Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge

Veröffentlichungen:

Härner, D., Windhorst, C., Böhner, N., Novion Ducassou, J., Couté, Y., Gescher, J., 2021. Production of acetoin from renewable resources under heterotrophic and mixotrophic conditions. *Bioresour. Technol.* 329. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124866>

Ali, R., Saravia, F., Hille-Reichel, A., Härner, D., Gescher, J., Horn, H., 2020. Enhanced production of propionic acid through acidic hydrolysis by choice of inoculum. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* jctb.6529. <https://doi.org/10.1002/jctb.6529>

Hörner, M., Gerhardt, K., Salavei, P., Hoess, P., Härner, D., Kaiser, J., Tabor, J.J., Weber, W., 2019. Production of Phytochromes by High-Cell-Density *E. coli* Fermentation. *ACS Synth. Biol.* 8, 2442–2450. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b00267>

Konferenzbeiträge:

Poster-Präsentation auf der ISMET7, *International society for microbial electrochemistry and technology*, Okinawa (JP), 2019 - Härner, D., Schmidt, A., Windhorst, C., Böhner, N., Ali, R., Horn, H., Gescher, J 2019. A biorefinery concept for food waste using a microbial electrolysis cell.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	I
Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge	II
Inhaltsverzeichnis	III
Zusammenfassung	VI
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	X
Abkürzungsverzeichnis	XI
1. Einleitung	1
1.1 Allgemeine Definition Bioraffinerie	2
1.2 Lebensmittelabfälle – Aktuelle Lage und Behandlungsoptionen	5
1.2.1 Optionen der Behandlung von Lebensmittelabfällen	6
1.3 Dunkelfermentation	8
1.3.1 Technologischer Stellenwert der Dunkelfermentation	9
1.3.2 Dunkelfermentation als integrales Modul der Bioraffinerie	11
1.4 Bioelektrochemische Systeme	12
1.4.1 Reaktorsysteme für mikrobielle elektrochemische Systeme (MET)	13
1.4.2 Der extrazelluläre Elektronentransfer in BES	15
1.5 Aktueller Stand der petrochemischen Industrie	18
1.5.1 Plattformchemikalien	18
1.5.2 <i>Cupriavidus necator</i>	19
1.6 Zielsetzung	22
2. Material und Methoden	23
2.1 Chemikalien	23
2.2 Bakterienstämme	23
2.3 Geräte	23
2.4 Oligonukleotide	24
2.5 Medien und Puffer	24
2.6 Prozesssubstrat für das bioelektrochemische System	28
2.7 Produktionsstamm Acetoin	28
2.8 Kultivierung von Bakterienstämmen	30

2.8.1	<i>Geobacter sulfurreducens</i> PCA.....	30
2.8.2	<i>C. necator</i> H16_Δ <i>acoABC_ΔphaC1_ΔphaC2</i> pKR <i>phb-alsSD</i>	30
2.9	Konservierung von Bakterienstämmen	30
2.10	Gewinnung und Aufreinigung von Nukleinsäuren	31
2.10.1	Präparation von genomischer DNA.....	31
2.10.2	Präparation von gesamt RNA	31
2.11	Genetische Methoden.....	32
2.11.1	Polymerase Kettenreaktion.....	32
2.11.2	Gelelektrophorese	33
2.12	Quantifizierung von DNA und RNA	33
2.13	Sequenzierungen	33
2.13.1	Sanger-Sequenzierung – Kettenabbruchmethode.....	33
2.13.2	Illumina-Sequenzierung.....	33
2.14	Bioinformatische Auswertung	34
2.14.1	16S-rDNA-Gen-Amplikon-Sequenzierung	34
2.14.2	Metagenom-/Metatranskriptom-Analyse.....	34
2.15	Elektrochemische Methoden.....	37
2.15.1	System nach Golitsch, 2016	38
2.15.2	<i>Flat-Plate-Cell</i> System (FPC System)	39
2.15.3	Bioelektrochemische Betriebsmodi	40
2.16	Analytische Methoden	41
2.16.1	High Performance Liquid Chromatographie - HPLC.....	41
2.16.2	Gaschromatographie - GC	41
2.16.3	Micro Gaschromatographie - μGC	42
2.16.4	Bestimmung des löslichen Kohlenstoffes.....	42
2.16.5	Ionenchromatographie - IC.....	43
2.17	Evaluationsparameter.....	43
2.17.1	Berechnung der Acetoin-Ausbeute.....	43
2.17.2	Wachstumsrate.....	44
2.17.3	Coulomb´sche Effizienz	44
2.17.4	Mittlere Stromdichte.....	44
3.	Ergebnisse	45
3.1	Anodisches Konsortium	45
3.1.1	Initiale Anreicherung eines exoelektrogenen Konsortiums.....	45
3.1.2	Anreicherungsstrategie	47
3.1.3	Transferbasierte Anreicherung	49
3.1.4	16S-Diversitäts-Analyse	52

3.1.5	Metagenom- und Metatranskriptom-Analyse des Biofilms	54
3.2	Untersuchung der mikrobiellen Interaktion.....	61
3.3	Charakterisierung der Hydrolyseflüssigkeit	63
3.3.1	Initialer Wachstumsversuch	63
3.3.2	Analytische Charakterisierung der Hydrolyseflüssigkeit.....	64
3.4	Prozessstrategie Durchflussadaptation	68
3.5	Anodische Elimination von Acetat und Butyrat im FPC-System	69
3.6	Acetoin-Produktion unter verschiedene Prozessszenarien	72
3.6.1	Heterotrophe Acetoin-Produktion	72
3.6.2	Mixotrophe Acetoin-Produktion.....	75
4.	Diskussion	77
4.1	Anodisches Konsortium	78
4.1.1	Anreicherung exoelektrogener butyrat-oxidierender Mikroorganismen	78
4.1.2	Metagenom-Analyse.....	82
4.1.3	Metatranskriptom-Analyse	85
4.1.4	Mikrobielle Interaktion der funktionalen exoelektrogenen Hauptakteure.....	90
4.2	Einflussfaktor Substrat	91
4.3	Anwendungsorientierte Umsetzung im Fließzellensystem	95
4.4	Biokatalytische Veredelung – Acetoin-Produktion.....	99
5.	Ausblick.....	103
6.	Literaturverzeichnis.....	105
	Anhang	129
	Danksagung.....	134

Zusammenfassung

Das 21. Jahrhundert ist durch eine voranschreitende Globalisierung und Digitalisierung gekennzeichnet, wobei fossile Ressourcen und deren Energie- und Verarbeitungspotential jahrzehntelang die treibende Kraft bildeten. Unter Aspekten der nutzungsbedingten Klimaschädigung und Endlichkeit, rücken jedoch zunehmend Ansätze in den Fokus, deren Prozessabfolge eine nachhaltigere Energie- und Rohstoffbereitstellung ermöglichen. Während schon jetzt erneuerbare Energieträger die Energiebereitstellung kompensieren, stellt Biomasse die einzig nicht fossile Kohlenstoffquelle dar, deren regenerative Eigenschaft die abfallfreie Produkterzeugung erlaubt. Hierbei besitzen vor allem biogene Abfallstoffe ein hohes Potential, deren Aufkommen bisher als Herausforderung angesehen wird. Das Nutzungspotential dieser Ressource wird derzeit nur wenig effizient für die Erzeugung von Biogas oder Kompost genutzt, da die Konversion in höherwertige Verbindungen aufgrund der hohen Substratdiversität und -komplexität nicht umsetzbar ist.

In dieser Arbeit wird eine innovative Prozessstraße vorgestellt, die durch die Verschaltung verschiedener Bioprozesse die bisherige Limitierung der biotechnologischen Nutzung biogener Abfallströme überwindet und die strategische Abfallumwandlung mit einer vorteilhaften Produktverwertung vereint.

Die Prozessstraße ist initial durch einen Dunkelfermentationsprozess gekennzeichnet, wobei die robuste Prozessabfolge die Konversion eines hoch diversen Abfallstroms in die bioverfügbaren und löslichen Fettsäuren Acetat, Propionat und Butyrat ermöglicht. Im Weiteren dient dieser säurehaltige Effluent als Substrat in einer mikrobiellen Elektrolysezelle, wobei die Oxidation organischer Verbindungen mit der Übertragung respiratorisch erzeugter Elektronen auf eine Anodenoberfläche gekoppelt wird. Durch die geeignete Wahl von Biokatalysatoren, kann selektiv die Acetat- und Butyrat-Oxidation ermöglicht werden, die mit der Erzeugung eines elektrischen Stroms und Wasserstoff einhergeht. Die resultierenden Produkte, Propionat und Wasserstoff sind *per se* hochwertige Komponenten, können jedoch auch durch einen biotechnologischen Integrationsschritt weiter veredelt werden.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde eine geeignete exoelektrogene Gemeinschaft aus einer Umweltprobe angereichert, systembiologisch charakterisiert und deren effiziente und selektive Butyrat-Elimination für den Prozess gezeigt. Durch die Zugabe des Deltaproteobakteriums *Geobacter sulfurreducens* wurde das Substratspektrum der Gemeinschaft erweitert und so eine hoch robuste und funktionale exoelektrogene Gemeinschaft für die selektive Acetat- und Butyrat-Elimination etabliert.

Im zweiten Teil wurden inhibierende Prozessfaktoren des säurehaltigen Effluenten identifiziert und eine geeignete Prozessstrategie entwickelt, deren Anforderungen des speziellen anodischen Prozesses Rechnung tragen. Im Weiteren wurden die gewonnenen Erkenntnisse und Faktoren auf ein anwendungsorientiertes Fließzellenmodell übertragen und dessen Praktikabilität anhand einer Stromdichte von bis zu $620 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ und einer DOC_{VFA} Entfernungsrates von 95 % gezeigt. Im abschließenden Teil der Reaktionskaskade wurde die effiziente Acetoin-Synthese für verschiedene Prozessszenarien und -schwankungen gezeigt, die mit Kohlenstoffausbeuten von mehr als 70 % einhergingen.

Im Überblick wird durch diese Arbeit eine innovative Bioraffineriestraße vorgeschlagen, welche ausgehend von einem biogenen Abfallstrom die Entsorgungsherausforderung organischer Reststoffe mit der Umsetzung wertiger Produkte ermöglicht.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Biologische Abbaustufen einer Dunkelfermentation.	8
Abb. 2: Schematischer Aufbau der verschiedenen bioelektrochemischen Systeme.	14
Abb. 3: Extrazellulärer Elektronentransfer auf eine Anode.	17
Abb. 4: Zusammenfassung der für die Produktion von Acetoin relevanten Stoffwechselwege (<i>C. necator</i> H16).....	21
Abb. 5: Aufbau des bioelektrochemischen Systems nach Golitsch, 2016.	38
Abb. 6: Aufbau des FPC Systems, konstruiert und gebaut in der Gruppe von Prof. Sven Kerzenmacher (Fachgebiet Umweltverfahrenstechnik Universität Bremen).	39
Abb. 7: Initiale Anreicherung butyrat-oxidierender exoelektrogener Mikroorganismen.	46
Abb. 8: Transfermethoden der Anreicherung exoelektrogener Mikroorganismen.	47
Abb. 9: Lokalisierung der angereicherten butyrat-oxidierenden Mikroorganismen.	48
Abb. 10: Transferbasierte Anreicherung exoelektrogener butyrat-oxidierender Organismen.	50
Abb. 11: Coulomb'sche Effizienz (CE) in % der Transfergenerationen aus Abb. 10.	52
Abb. 12: 16S-rDNA-Amplikon-Sequenzierung des angereicherten butyrat-oxidierendem Konsortiums.	53
Abb. 13: Taxonomische Klassifikation der Metagenom-Sequenzierung der 7. Elektroden generation.	56
Abb. 14: Mikrobielle Interaktion mit und ohne die Zugabe von <i>G. sulfurreducens</i>	62
Abb. 15: Physiologischer Einfluss verschiedener Konzentrationen von Hydrolyseflüssigkeit auf den Laborstammes <i>G. sulfurreducens</i>	63
Abb. 16: Zellwachstum von <i>G. sulfurreducens</i> in Abhängigkeit eines Gemisches aus Acetat, Propionat und Butyrat.	65
Abb. 17: Physiologischer Einfluss der drei Carboxylsäuren auf den Laborstamm <i>G. sulfurreducens</i>	66
Abb. 18: Physiologischer Einfluss von einwertigen Ionen auf den Laborstamm <i>G. sulfurreducens</i>	67
Abb. 19: Bioelektrochemische Adaptation von <i>G. sulfurreducens</i> an Hydrolyseflüssigkeit im System nach Golitsch (2016).	69
Abb. 20: Bioelektrochemische Abreinigung von Hydrolyseflüssigkeit durch <i>G. sulfurreducens</i> und butyrat-oxidierendem Konsortium im FPC-System.	70
Abb. 21: Heterotrophe Acetoin-Produktion ausgehend von einer Mischung aus Acetat, Propionat und Butyrat.	73
Abb. 22: Heterotrophe Acetoin-Produktion unter individueller Carboxylsäure-Zugabe.	74
Abb. 23: Acetoin-Produktion unter Verwendung von Acetat, Propionat und Butyrat unter mixotrophen Bedingungen.	75
Abb. 24: Mixotrophe Acetoin-Produktion.	76
Abb. 25: Modell des exoelektrogenen Butyrat-Abbaus in der angereicherten Gemeinschaft.	89
Abb. 26: Gesamtausbeuten an Acetoin entsprechend den getesteten Bedingungen und Substraten. .	102
Abb. 27: Summenformel für die heterotrophe Acetoin-Produktion.	129
Abb. 28: Summenformel für die mixotrophe Acetoin-Produktion.	130

Abb. 29: Untersuchung der exoelektrogener butyrat-oxidierender Mikroorganismen unter Zugabe von <i>G. sulfurreducens</i>	131
Abb. 30: Bioelektrochemische Adaptation von <i>G. sulfurreducens</i> an Hydrolyseflüssigkeit im System nach Golitsch, 2016.....	132

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete Bakterienstämme und deren genetischer Hintergrund.	23
Tab. 2: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Primer.	24
Tab. 3: Zusammensetzung des verwendeten Lysogeny Broth-Medium nach Lennox.	24
Tab. 4: Zusammensetzung des Anzuchtmediums für <i>Geobacter sulfurreducens</i>	25
Tab. 5: Zusammensetzung der <i>Geobacter</i> NB-Spurenelementlösung (100x).	25
Tab. 6: Zusammensetzung der DSMZ-141 Vitaminlösung (100x).	26
Tab. 7: Zusammensetzung des Waschmediums für <i>Geobacter sulfurreducens</i>	26
Tab. 8: Anodenmedium für die Anreicherung exoelektrogener Mikroorganismen.	27
Tab. 9: Zusammensetzung der 7-Vitaminlösung (100x) nach DSMZ-141.	27
Tab. 10: Zusammensetzung Mineral Medium für chemolithotrophes Wachstums nach DSMZ 81.	28
Tab. 11: Zusammensetzung der in Tab. 10 verwendeten Komplementierungslösungen.	29
Tab. 12: PCR-Programm zur Detektion von DNA-Verunreinigungen.	31
Tab. 13: Zusammensetzung der Mango-Mix und HiFi Q5 Reaktionsansätze.	32
Tab. 14: PCR-Programme für die verwendeten MangoMix und HiFiQ5-Ansätze.	32
Tab. 15: Assembly-Statistiken des analysierten Metagenoms und -transkriptoms.	55
Tab. 16: Taxonomisch Statistik der Metagenom Analyse.	55
Tab. 17: Binning Statistik der fünf erhaltenen taxonomischen Bins.	57
Tab. 18: TPM-Werte für die Schlüssel-Biomarker der anodischen Butyrat-Oxidation.	58
Tab. 19: Zusammenfassung der chromatographischen Untersuchungen der Hydrolyseflüssigkeit.	64
Tab. 20: IC-Analyse der Hydrolyseflüssigkeit.	64
Tab. 21: Anteil des löslicher Gesamtkohlenstoffes ausgewählter Proben des <i>FPC</i> -Experiments.	71
Tab. 22: Vergleich der Metagenom- und 16S-Amplikon-Analyse auf Klassenebene.	83
Tab. 23: BLAST-Analyse der isolierten 16S-rDNA-Gensequenzen für die <i>Geobacter</i> -Gattung.	133

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
Ag/AgCl	Silber/Silberchlorid-Referenzelektrode
ATP	Adenosintriphosphat
BES	Bioelektrochemisches System
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
CB-Zyklus	Calvin-Benson-Zyklus
CE	Coulomb Effizienz
<i>C. necator</i>	<i>Cupriavidus necator</i>
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DOC	Gelöster Gesamtkohlenstoff
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EET	Extrazellulärer Elektronentransport
e ⁻	Elektronen
(μ) GC	(Mikro) Gaschromatographie
<i>G. sulfurreducens</i>	<i>Geobacter sulfurreducens</i>
HRT	<i>Hydraulic Retention Time</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IC	Ionenchromatographie
MFC	<i>Microbial Fuel Cell</i>
Mil.	Millionen
Mrd.	Milliarden
NAD ⁺	Oxidierter Form des Nicotin-Amid-Dinukleotids
NADH	Reduzierter Form des Nicotin-Amid-Dinukleotids
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
OTU	<i>Operational Taxonomic Unit</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PHB	Polyhydroxybuttersäure
RT	Raumtemperatur
RNA	Ribonukleinsäure
RuBisCO	Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
<i>S. oneidensis</i>	<i>Shewanella oneidensis</i>
SHE	<i>Standard Hydrogen Electrode</i>
TC	totaler (gesamter) Kohlenstoff
TCA	Citratzyklus
TIC	gesamter anorganischer Kohlenstoff
TN	gesamter gebundener Stickstoff
TOC	gesamter organischer Kohlenstoff
TPM	<i>Transcripts Per kilobase Million</i>
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/w)	Gewichtsprozent
wt	Wildtyp
Δ	Deletion

1. Einleitung

In den letzten Jahren sind gesellschaftliche Bedenken im Zusammenhang mit anthropogenen Veränderungen des globalen Ökosystems zu einem wichtigen Treiber der politischen und gesellschaftlichen Agenda geworden. Paradigmen wie Nachhaltigkeit und das ökologische Gleichgewicht prägen zunehmend das sozioökonomische Gefüge, was nicht zuletzt auf die Erschöpfung fossiler Ressourcen und deren monopolistischen Stellung im Energie- und Erzeugungssektor zurückzuführen ist.

In diesem Zusammenhang strebt die Gesellschaft nach Ansätzen, die die Erschließung alternativer und bisher ungenutzter Ressourcen umfassen. Während schon jetzt die Nutzung von Wind-, Wasser- und Sonnenenergie den Einsatz fossiler Brennstoffe im Energiesektor kompensieren könnte, gestaltet sich die Transition der chemischen Industrie, die sich mit der Umwandlung von (fossilen) Rohstoffen in Mehrwertprodukte, wie Polymere, Plattformchemikalien und Kraftstoffe befasst, deutlich komplexer.

Biomasse als regenerative Ressourcenquelle bildet dabei die einzig nicht fossile Kohlenstoffquelle neben CO₂, die die Integration in nachhaltige und abfallfreie Konversionsprozesse erlaubt. In Anbetracht der stetig wachsenden Weltbevölkerung und deren Konsumverhaltens, erscheinen biogene Reststoffe, die keine Verwendung als Lebensmittel- oder Konsumgegenstand finden, als geeignete und attraktive Ausgangsstoffe. Während die derzeitige Biomassen-Nutzung meist nur in Form weniger Produkte mit einem geringen wirtschaftlichen Wert erfolgt (Biogas, Kompost), erscheinen Bioraffinerie-Ansätze als wertvolle Strategie zur Erzeugung eines breiten Spektrums marktfähiger Produkte aus biogenen Reststoffen (Alibardi *et al.*, 2020; Cherubini, 2010).

1.1 Allgemeine Definition Bioraffinerie

Der Begriff Bioraffinerie wird derzeit für eine Vielzahl von Konzepten und Prozessen in Zusammenhang mit der Veredelung von Biomasse genutzt. Im engeren Sinn beschreiben diese Ansätze ein integratives und multifunktionales Gesamtkonzept, das jegliche Art von Biomasse als Rohstoffquelle für die nachhaltige Produktion eines breiten Spektrums unterschiedlicher Produkte unter möglichst vollständiger Nutzung aller Komponenten und Kopplungsintermediate nutzt (Kamm, 2010; *Natural Renewable Energy Lab*, 2009).

Terminologisch leitet sich der Begriff von der petrochemischen Raffinerie ab, wobei analog jede Fraktion des Rohöls durch optimierte Prozesse in höherwertige Produkte aufgewertet wird (Esposito & Antonietti, 2015). Angelehnt daran umfassen Bioraffinerie-Ansätze, Verfahrensstrukturen, die unter Verschaltung verschiedener Möglichkeiten zur nachhaltigen Aufwertung des eingesetzten Substrats führen sollen (Clark *et al.*, 2012). Unter Verkettung biologischer und chemischer Module, dienen mechanische, enzymatische oder pyrolytische Schritte der initialen Rohstoffzugänglichkeit, gefolgt von der Konversion in Grundstoffe wie Stärke, Zucker oder organischen Säuren als Plattform. Im Weiteren erfolgt die Veredelung, die in Abhängigkeit des angestrebten Zielprodukts thermochemische und/oder biotechnologische Verfahren umfassen kann (Lopes, 2015). Ungeachtet der Verfahrensstruktur weisen beide Konzepte jedoch auch Unterschiede auf.

Substratseitig besitzen die jeweiligen Einsatzstoffe unterschiedliche physiochemische Eigenschaften. Rohöl ist in der Regel homogen, flüssig und durch einen geringen Sauerstoffgehalt geprägt, während Biomasse ein heterogener Feststoff mit einem hohen Sauerstoffgehalt ist (Brun *et al.*, 2017). Dies impliziert deutliche Unterschiede in der Verarbeitung. Während traditionelle Derivatisierungsmethoden von aus Öl gewonnenen Substanzen Oxidationsschritte zur Einführung chemischer Funktionalität nutzen, zielen Bioraffinerieprozesse auf die Entfernung von dieser Funktionalität ab, um die Komplexität der Biomoleküle zu vereinfachen.

Im Letzteren besteht die Herausforderung durch Verfahrensstrategien entweder selektiv die chemischen Funktionalitäten zu erhalten oder diese synthetisch wieder einzuführen (Stubba *et al.*, 2015). Auch die Verfügbarkeit von Biomasse und fossilen Ressourcen unterscheidet sich grundlegend - während fossile Ressourcen von Natur aus endlich und in definiert geologischen Formationen vorkommen, ist Biomasse erneuerbar, variabel, ubiquitär verteilt und nur durch die Effizienz der Photosynthese limitiert (Beadle & Long, 1985; Brun *et al.*, 2017).

Die anfänglichen Bioraffinerie-Ansätze fokussierten sich daher auf die Verarbeitung von Agrarrohstoffen wie Mais, Getreide und Zuckerrüben. Die typischen Produkte stellten dabei Kohlenwasserstoff-Kraftstoffe, Treibstoff-Additive und pyrolytische (Bio)-Öle dar (Fairley, 2011). Im Fall der Bioethanol-Produktion erfolgte unter Einsatz nativer Biokatalysatoren wie *Saccharomyces cerevisiae* oder *Zymomonas mobilis* die großflächige industrielle Fermentation. Angesichts des hohen Lignocellulose-Anteils von Mais und Getreidepflanzen, die eine chemische Verflüssigung und anschließende biologische Saccharifizierung voraussetzen, geriet der Fokus jedoch zunehmend auf die Zuckerrübe. Der im Vergleich ertragreichere Anbau und hohe Saccharose-Anteil ermöglichte eine direkte Umsetzung und somit effizientere Produktion von Bioethanol (Clark *et al.*, 2012).

Die Veredlung nachhaltig erzeugter Biomasse stellt eine neuartige Möglichkeit der ökonomischen Produkterzeugung dar, jedoch kam es zunehmend zu einer sozioökonomischen Nutzungskonkurrenz zwischen den Energie- und Nahrungspflanzen (Esposito & Antonietti, 2015). Weitere bis dahin unbeachtete Faktoren bildeten den auf die Landwirtschaft ausgeübten Druck der Landnutzungsänderung, der im Weiteren mit einer verstärkten Düngung und damit verbundenen Erhöhung der Phosphor- und Stickstoffkonzentration im Grundwasser korrelierte (Caspeta *et al.*, 2013). Die resultierenden Umweltauswirkungen lassen sich noch bis heute an dem jährlich auftretenden sogenannten „Algen-Boom“ im Golf von Mexiko beobachten (Graham-Rowe, 2011; Martin, 2011). Als Folge unterstrich dies die Notwendigkeit der Systemintegrationsforschung, um die Auswirkung der Biomassennutzung über vernetzte Bereiche hinweg abzuschätzen und negative Umwelteinflüsse zu vermeiden (Armaroli & Balzani, 2016).

So fokussieren sich Bioraffinerie-Ansätze der 2. Generation nicht auf die Produktion großvolumig benötigter Erzeugnisse, sondern auf Produkte mit einem geringeren Marktvolumen, wie z.B. Plattformchemikalien. Diese meist sehr wertvollen und marktfähigen Produkte werden im Vergleich zu Kraftstoffen in geringeren Mengen benötigt, was die Nutzung biogener Reststoffe mit einem geringeren Aufkommen ermöglicht (Bruijninx & Weckhuysen, 2013). Generell hat die Herstellung von Plattformchemikalien aus biogenen Abfallstoffen das Potential, deren Wert zusätzlich zu erhöhen ohne die derzeitigen petrochemischen Routen neu auszurichten oder verändern zu müssen (Brun *et al.*, 2017). Die gängigsten Ausgangsstoffe bilden hierbei lignozellulosehaltige Pflanzenabfälle, deren Zusammensetzung meist hoch heterogen ist (z.B. Ernteresten, Holz oder Stroh). Gekennzeichnet durch einen hohen Polysaccharid- (Cellulose, Hemicellulose, 60 - 80 % wt) und aromatischen Lignin-Anteil (15 - 30 % wt), liegen diese meist als gebundenes Nanokomposit vor und müssen vor der

biologischen Weiterverarbeitung zunächst hydrolysiert werden (Azizi Samir *et al.*, 2005; Lynd *et al.*, 2002; Sun & Barta, 2018). Hierbei kommen mechanische und/oder chemische Vorbehandlungsstrategien zum Einsatz, die unter hohen Prozesstemperaturen und -drücken die Depolymerisierung der Bestandteile in eine Mischung aus organischen Molekülen (z.B. Kohlenhydrate) und nicht abbaubaren Bestandteilen (Lignin, Cellulose) ermöglichen (Pu *et al.*, 2013; Taherzadeh & Karimi, 2008). Die direkte Konversion der Mischung ist etwa durch thermochemische Prozesse in pyrolytische Öle möglich, jedoch gestaltet sich die Veredelung dieser Öle in höherwertige Produkte schwierig (Kumar *et al.*, 2020). Daher setzen modernere Strategien auf die Separierung der Mischung, wobei die organischen Moleküle unter Einsatz von chemischen oder biologischen Katalysatoren - abgesehen von Biokraftstoff - in Endprodukte wie Laktat, Lävulinsäure, Hydroxymethylfurfural und andere umgewandelt werden können (Al-Naji *et al.*, 2020; Dusselier & Sels, 2014; Yuan *et al.*, 2018).

Ungeachtet der finalen Veredelungsmöglichkeiten gerät der Fokus jedoch zunehmend auf organische Abfallstoffe, die eine weniger strukturell/komplexe Zusammensetzung aufweisen und eine verfahrenstechnisch einfachere Zugänglichkeit besitzen (Wong *et al.*, 2020). Unter Aspekten der einfachen biologischen Zugänglichkeit, definiert als ein hoher Kohlenhydrat- und Proteinanteil, geraten zunehmend Lebensmittelabfälle in den Fokus von Bioraffinerie-Konzepten (Alibardi *et al.*, 2020; Pyrgakis & Kokossis, 2019). Darüber hinaus handelt es sich um „*non-food*“ Biomasse, wodurch eine Nutzungskonkurrenz zwischen Energie- und Nahrungsmittelstoffen ausgeschlossen werden kann.

1.2 Lebensmittelabfälle – Aktuelle Lage und Behandlungsoptionen

Die Notwendigkeit, eine Energie- und Ressourcenknappheit zu überwinden, gibt Anlass zur Entwicklung innovativer und praktischer Technologien für die Wiederverwertung nützlicher Stoffe aus Abfallströmen.

Lebensmittelabfälle gehören neben Agrarreststoffen zu den am häufigsten anfallenden organischen Abfällen der Welt. Der Begriff umschließt dabei sowohl Stoffe, die während des Produktionsvorgangs entstehen, als auch nicht mehr genießbare Nahrungsmittel (FAO, 2016). Die Ursachen der Verendung treten dabei vielfältig in jeder Ebene beim Erzeuger und Verbraucher auf. In Entwicklungsländern fallen die Ausschüsse überwiegend durch vorzeitige Ernte oder unzureichende Verarbeitungsanlagen beim Erzeuger an, während in Industrienationen der Ausschuss beim Händler und Konsument durch Überangebotskäufe und Mindesthaltbarkeitsdaten zu finden ist (Giroto *et al.*, 2015).

Schätzungen der *Food and Agriculture Organization* (FAO) zufolge, werden jährlich etwa 1,3 Billionen Tonnen genießbare Nahrungsmittel verworfen. Dies entspricht etwa einem Drittel der global zur Verfügung stehenden Lebensmitteln (FAO, 2016). Weitere Studien zeigen, dass im Jahre 2010 in den USA 60 von 195 Mil. Tonnen der verfügbaren Lebensmittel mit einem geschätzten Gesamtwert (Marktpreis und Entsorgungskosten) von etwa 161,6 Mrd. US-Dollar verworfen wurden (Buzby *et al.*, 2014). In Europa wird die jährliche Menge auf etwa 88 Mil. Tonnen geschätzt, wobei aktuelle Studien davon ausgehen, dass die Menge bis 2025 auf etwa 126 Mil. Tonnen ansteigen wird (Stenmarck & Jensen, 2016). So stellt die Entsorgung von Lebensmittelabfällen ein wachsend kritisches Thema dar, das mit einem zunehmend globalen Nahrungsmittelangebot korreliert. Abgesehen von den finanziellen Einbußen fördert die Lebensmittelverschwendung auch den Klimawandel. In aktuellen Studien wird davon ausgegangen, dass ca. 18 % aller menschengemachter Treibhausgase auf die Produktion/Überproduktion und Entsorgung von Lebensmitteln zurückzuführen sind. Das Ausmaß verschärft dabei nicht nur den Klimawandel, sondern auch die globale Nahrungsmittelproduktion, wobei die Ausweitung von Anbau- und Weidefläche immer mehr Wald vernichtet, wodurch die globale Erwärmung beschleunigt und in negativer-Rückkopplung die landwirtschaftlichen Erträge vermindert (FAO, 2019).

In Anbetracht der genannten Mengen und der einfachen biologischen Zugänglichkeit, erscheint es umso wichtiger, dessen nachhaltige und erneuerbare Eigenschaften in effizienten Prozessstraßen für die Sekundärveredelung zu nutzen.

1.2.1 Optionen der Behandlung von Lebensmittelabfällen

Lebensmittelabfälle zeichnen sich typischerweise durch einen hohen Anteil an organisch und biologisch abbaubaren Stoffen aus (ca. 60 % Kohlehydrate, 20 % Eiweiße und 10 % Lipide), die sie zu einem vielversprechenden Sekundärrohstoff für bio-basierte Verfahren macht (Pleissner & Lin, 2013; Vavouraki *et al.*, 2013).

Traditionelle Behandlungsoptionen umfassen die Deponierung, Kompostierung und Biogasproduktion, die in ihrer Gesamtheit einen größeren negativen Umwelteinfluss besitzen als dass sie einen ökologischen wirtschaftlichen Vorteil bieten (Lombardi & Francini, 2020). Die Anwendbarkeit der jeweiligen Ansätze variiert stark. Während ein Großteil des Abfalls in urbanen Städten anfällt, wo kein Platz für Biogasanlagen ist, erbringen diese in ländlichen Regionen keinen wirtschaftlichen Kosten-Nutzen-Faktor, aufgrund des geringen Abfallaufkommens. Zusätzlich emittiert jede Tonne Lebensmittelabfall bis zur Verarbeitung mehr als 4,2 Tonnen CO₂, ungeachtet der Sekundäremission in Boden und Wasser (Lin *et al.*, 2013). Die bisherige Nutzung der Ressource zur Erzeugung von Strom oder Tierfutter erzielt einen wirtschaftlichen Wert von ca. 60 - 300 US-Dollar pro Tonne. Im Gegensatz lässt die Isolation chemischer Produkte den Wert auf bis zu 1000 Dollar pro Tonne ansteigen (Tuck *et al.*, 2012). Daher hat jüngst die Verwertung von Lebensmittelabfällen das Interesse geweckt, abseits der traditionellen Routen, innovative Verfahren unter Einsatz einer geringeren Sekundärverschmutzung und einem höheren Rückgewinnungsgrad umzusetzen (Lam *et al.*, 2018).

Extraktionsansätze zielen auf die native Isolation höherwertiger Chemikalien und Stoffe ab, bevor es zu einer bio- oder thermochemischen Inaktivierung des Rohstoffes kommt. Die gängigsten Methoden bilden hierbei überkritische CO₂-Extraktionen oder Hydrodestillationen. Beide Anwendungen sind non-invasiv und dienen der Rückgewinnung von Aromen, Vitaminen oder Geschmackstoffen (Brunner, 2005). Die hohe Selektivität der Methoden ermöglicht eine spezifische Isolation, ohne dass es zu einer Ko-Extraktion von Pigmenten, polaren Lipiden oder freien Zuckern kommt. Als Nachteil ist der hohe Energieverbrauch dieser Prozesse zu nennen, weshalb sich deren Einsatz nur bei einer günstigen Energiebereitstellung lohnt (Clark *et al.*, 2012).

Thermochemische Ansätze bedienen sich Verfahren wie der Vergasung, der Pyrolyse oder der hydrothermalen Konversion, zur Erzeugung von Gasen, Ölen oder (Bio)Kohle. Die schnelle Prozessabfolge dieser Methoden bilden die Hauptvorteile, jedoch sind diese wenig selektiv und spezifisch ausgerichtet. Darüber hinaus benötigen solche Ansätze zumeist hohe

Verfahrenstemperaturen und -drücke, die auch hier die Energieeffizienz negativ beeinflussen (Tradler *et al.*, 2018).

Die letzte Möglichkeit umfasst **biochemische Verfahren**, wobei unter Einsatz genetisch optimierter Biokatalysatoren, wie z.B. Mikroorganismen oder Enzymen, eine gezielte Substrat-zu-Produktumsetzung ermöglicht wird. Entscheidende Vorteile dieser Methode ist die hohe Substratselektivität, die eine direkte Konversion von Lebensmittelabfällen in Plattformchemikalien wie Acetat oder Succinat ermöglicht (Sun *et al.*, 2014). Die gezielte Konversion benötigt jedoch häufig thermische oder chemische Vorbehandlungsschritte, die zum einen die Substratkomplexität reduzieren und zum anderen aseptische Bedingungen voraussetzen. In Kombination mit einer verminderten Raum-Zeit-Ausbeute und einer herausfordernden Downstream-Prozessierung (Destillation oder Membranfiltration), zeigen sich auch hier entscheidende Nachteile (Kamm, 2010).

Unter Zusammenfassung der vorgestellten Möglichkeiten, bildet die saisonale und lokale Substratvariabilität eine nicht vernachlässigbare wirtschaftliche Limitierung der Umsetzbarkeit. In dieser Hinsicht beschreibt die Dunkelfermentation als fermentativer Ansatz die vielversprechendste Technologie, wobei ungeachtet der Substratkomplexität und -varianz die Konversion des Konvoluts in bioverfügbare Substanzen und Wasserstoff ermöglicht ist.

1.3 Dunkelfermentation

Die Dunkelfermentation, auch als ein Teilprozess der Biogasproduktion bekannt, stellt die einfachste Möglichkeit der fermentativen Konversion eines breiten organischen Substratspektrums in eine Mischung aus organischen und anorganischen Produkten dar. Der unter Ausschluss von Sauerstoff und Licht ablaufende Prozess ist durch eine Reihe biochemischer Reaktionen definiert, die sich in die Abschnitte der Hydrolyse, der Aceto- und der Acidogenese untergliedern lassen (Abb. 1). Im initialen Schritt erfolgt zunächst eine mikrobielle Hydrolyse, wobei das komplexe Substratkonvolut in kleinere organische Bausteine zerlegt wird. Unter der Einwirkung von membrangebundenen und sezernierten Hydrolasen erfolgt die Konversion von Polysacchariden, Proteinen und Fetten in Monosaccharide, Aminosäuren und Lipide (Pavlostathis & Gossett, 1986). In der darauffolgenden Acidogenese werden die Bausteine weiter durch anaerobe fermentierende Organismen in Verbindungen wie Alkohole, organische Säuren (Acetat, Propionat, Butyrat), H₂ und CO₂ verarbeitet. In der abschließenden Acetogenese werden die Intermediate unter Einwirkung acidogener, acetogener und syntropher Mikroorganismen primär in Acetat, Wasserstoff und CO₂ metabolisiert (Goswami *et al.*, 2016). In einem Biogasprozess würde sich die Methanogenese anschließen, die durch hydrogenotrophe und acetoklastische methanogene Organismen die Methanerzeugung ermöglicht. Da Dunkelfermentationsprozesse *per se* bei einem sauren pH-Wert ablaufen und methanogene Organismen hoch pH-empfindlich sind, wird dieser letzte Schritt unterbunden (Franke-Whittle *et al.*, 2014).

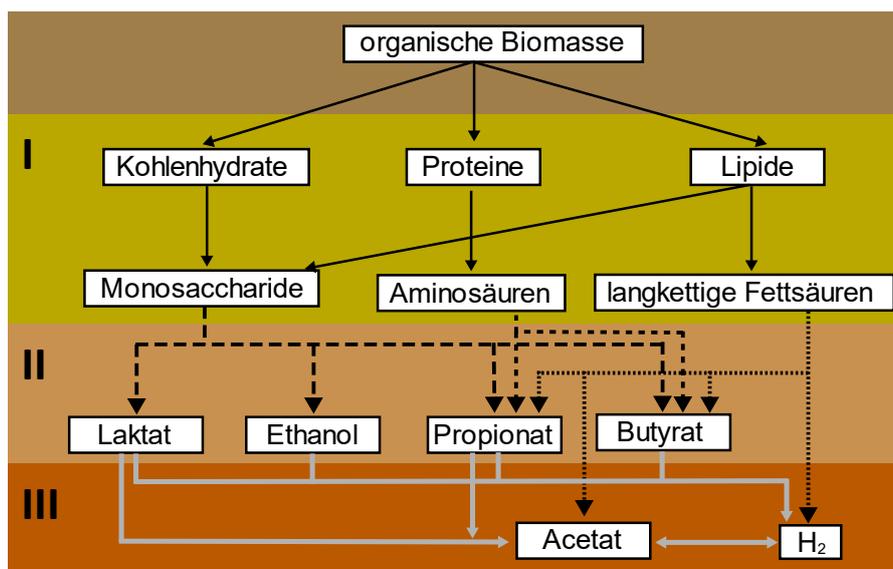


Abb. 1: Biologische Abbaustufen einer Dunkelfermentation. Dargestellt sind die drei Phasen einer Dunkelfermentation und deren jeweiligen Produkte: **I**) Hydrolyse (schwarze Pfeile), **II**) Acidogenese (gestrichelte Pfeile) und **III**) Acetogenese (graue Pfeile). Verändert nach Ghimire *et al.* 2015.

1.3.1 Technologischer Stellenwert der Dunkelfermentation

In jüngster Zeit erfährt die Dunkelfermentation als Möglichkeit der Vereinigung der organischen Abfallbehandlung mit der Wasserstoffproduktion ein zunehmend industrielles Interesse. Das Verfahren ist biochemisch robust, die Ausgangssubstrate günstig und der Verfahrensverlauf technisch wenig aufwendig (Alibardi *et al.*, 2020). Das Substratspektrum reicht von Klärschlamm über Pflanzenabfälle bis hin zu Lebensmittelabfällen, deren Verwertung mittels traditioneller Methoden nicht nachhaltiger und ökologischer umgesetzt werden könnte (Ali *et al.*, 2020; Wong *et al.*, 2014). Im Vergleich zur Biogasproduktion ist die Substratkonversion schneller und die Reaktoren nehmen weniger Platz ein. Die Durchführung unter mesophilen Temperaturen (30 bis 40 °C) bei atmosphärischem Druck halten die Betriebskosten gering. Die Verwendung von fermentativen Mischkulturen ermöglicht einen biochemisch robusten Prozessverlauf, da diese weniger anfällig gegenüber Betriebsschwankungen sind (im. Vgl. zu Reinkulturen, Wang & Wan, 2009).

Das typische Produktspektrum besteht zumeist aus H₂ und organischen Nebenverbindungen (Acetat, Propionat, Butyrat und Ethanol). Gleichwohl in experimentellen Ansätzen nur 3 % H₂ erzeugt werden können (theoretische H₂-Ausbeute 33 %, 4 mol_{H₂}/ mol_{Glukose}) bilden 67 % (w/w) der Bestandteile die löslichen Nebenprodukte Acetat, Propionat und Butyrat. Auch wenn die geringe Wasserstoffeffizienz einen wesentlichen Engpass der kommerziellen Umsetzung darstellt, bilden die organischen Säuren Acetat, Propionat und Butyrat wichtige Ausgangsstoffe der verarbeitenden Industrie (Bastidas-Oyanedel *et al.*, 2015).

Während Acetat und Butyrat zur Herstellung von Cellulose-Derivaten dienen, wird Propionat primär zur Konservierung von Lebensmitteln und der Erzeugung von Pharmazeutika und Herbiziden genutzt. Die bisherige Synthese dieser Carboxylsäuren erfolgt petrochemisch, wobei ein zunehmendes Interesse an der nachhaltigeren Erzeugung besteht, um den Druck auf nicht erneuerbare Ressourcen zu reduzieren (Isipato *et al.*, 2020). Hierbei liegt der Fokus vor allem auf der Produktion von Propionat, das mit 1,8-2,3 €/kg im Vergleich den höchsten Marktwert besitzt (Butyrat 0,7 €/kg , Acetat 0,6 €/kg) (Research, 2015, 2020). Dies ist nicht zuletzt auf die Verwendung als Vorprodukt in aufstrebenden Sektoren der Biopolymerherstellung zu ergründen, wobei erwartet wird, dass der Markt bis 2026 mit einer jährlichen Rate von 3,5 % steigt (Liu *et al.*, 2012).

Aufgrund der Verwendung einer säurebildenden Mischkulturfermentation ist der Prozess der Dunkelfermentation hochkomplex und bisher wenig verstanden (Ghimire *et al.*, 2015). Daher fokussiert sich die Forschung zunehmend auf die Erarbeitung allgemein geltender Prozessparameter, die eine robuste Prozessvorhersage ermöglichen. Die maßgeblichen Stellschrauben bilden operative Parameter, wie die organische Substratbelastung, die hydraulische Verweilzeit (HRT), der pH-Wert und die Temperatur (Bastidas-Oyanedel *et al.*, 2015). So zeigen sich ausgehend von Lebensmittelabfällen, eine Vielzahl unterschiedlicher Parameter zur Beeinflussung des Produktspektrums, die jedoch teilweise kontroverse Prozessvorhersagen bieten. Cappai und Kollegen (2012) berichten von einem Wasserstoffoptimum bei pH 6,5, wobei gemeinhin pH 5,5 als Optimum angenommen wurde. Chen und Kollegen (2013) berichten von einer Propionatkonzentration von 2,7 g/l unter Verwendung einer Reinkultur (*Propionibacteria*), während Ergebnisse von Ali und Kollegen (2020) unter ähnlichen Bedingungen dies von einer Mischkultur berichten. Boyaval und Corre (1995) zeigten die erhöhte Propionat-Produktion im Batchreaktor mit Glycerol als Substrat, was gegensätzlich zu Studien von Liu und Kollegen (2017) ist, welche eine erhöhte Konzentration unter Einsatz eines Fed-Batch Reaktors zeigten.

Trotz der unterschiedlichen Angaben kann die Dunkelfermentation als Vorbehandlungsstrategie angesehen werden, die darauf abzielt, die komplexen Ausgangsabfallstoffe in einfachere lösliche Verbindungen zu hydrolysieren, um diese für nachgeschaltete Prozesse bereit zu stellen.

1.3.2 Dunkelfermentation als integrales Modul der Bioraffinerie

Die Dunkelfermentation vereint die Herausforderung der organischen Reststoffentsorgung mit der Erzeugung wertvoller Produkte. Die Produktintegration in bereits bestehende Prozesse ermöglicht dabei die Nutzung als integratives Modul in Bioraffinerie-Straßen. Im Folgenden sollen mögliche Veredelungsoptionen anhand der verschiedenen Ausgangsstoffe aufgezeigt werden.

Die gasförmigen Produkte, ein Gemisch aus H_2 und CO_2 kann zum einen der biologischen Methanproduktion dienen und zum anderen auch einzeln fraktioniert genutzt werden. Während Wasserstoff primär der Energieerzeugung (in Brennstoffzellen oder Heizkraftwerken) dient, kann CO_2 in chemischen Ansätzen für die beschleunigte Carbonisierung alkalischer Industrierückstände genutzt werden (Sanna *et al.*, 2014). Die biologische Nutzung von CO_2 umfasst zumeist mikrobielle Elektrosynthese-Ansätze zur Herstellung von Biopolymeren, Methan oder Acetat (Lombardi & Francini, 2020; Nevin *et al.*, 2010; Reiner *et al.*, 2020). Auch die autotrophe Nutzung des Gemisches für die Produktion von Lipiden oder Biodiesel mittels Algen oder Cyanobakterien ist möglich (Duppeti *et al.*, 2017; Venkata Mohan *et al.*, 2015).

Im Gegensatz dazu kann der fermentative Festkörper des Gärrestes für die Produktion von Wasserstoff durch chemisches Cracken genutzt werden. Die Isolation von Alkoholen aus der Flüssigphase ist nicht rentabel (1 % w/w), wobei die organischen Säuren (Acetat, Propionat und Butyrat - 67 % w/w) den deutlich wertigeren Bestandteil der Phase bilden (vgl. Abschnitt 1.3.1). Die Aufreinigung mittels Ionenaustauscher-, Membran- oder Elektrodialyse-Ansätzen ist beschrieben, jedoch erreichen diese Methoden bisher keine hohen Extraktionseffizienzen, die eine wirtschaftliche Umsetzung ermöglichen würden (Ali *et al.*, 2020; Jones *et al.*, 2017; Outram & Zhang, 2018; Rebecchi *et al.*, 2016). Basierend darauf zeigen sich zunehmende biologische Aufreinigungs- und Weiterverarbeitungsmethoden, wobei der säurehaltige Effluent zur Biopolymerherstellung oder der elektrischen Stromerzeugung in sogenannten bioelektrochemischen Systemen dienen kann (Kedia *et al.*, 2014; Schievano *et al.*, 2016). Im letzteren Fall koppeln Mikroorganismen die Oxidation organischer Verbindung mit der Übertragung respiratorischer Elektronen auf eine Anode. Hierbei kann durch die Kombination aus vorangehender Dunkelfermentation und bioelektrochemischer Behandlung die nachhaltige Entsorgung biogener Reststoffe mit der Erzeugung elektrischer Energie vereint werden. Im Weiteren kann durch den Einsatz geeigneter Mikroorganismen eine Spezifität erreicht werden, wobei selektiv bestimmte organische Säuren eliminiert und der resultierende Restfluss biokatalytisch weiter veredelt werden kann (Schmidt *et al.*, 2018).

1.4 Bioelektrochemische Systeme

In den letzten Jahren hat das wachsende Interesse an der Erzeugung emissionsarmer Energie durch Verwertung organischer Abfallstoffe die zukunftsorientierte Technologie der bioelektrochemischen Systeme zunehmend in den Fokus gerückt (Mohanakrishna *et al.*, 2020; Resch *et al.*, 2008). Bioelektrochemische Systeme (BES) umfassen eine Technologiegruppe, die abgeleitet von traditionellen elektrochemischen Systemen, die Schlüsseleigenschaft der operativen Reversibilität unter Einsatz biologischer Elemente teilen (Rabaey *et al.*, 2007; Schröder *et al.*, 2015). Hierbei können die Systeme auf der Grundlage ihrer biologischen Elemente in zwei verschiedene Gruppen untergliedert werden:

Erstere Gruppe umfasst die Verwendung biologischer Moleküle wie DNA, Antikörper oder Enzyme, die auf einer Elektrode immobilisiert, unter Vorgabe eines Potentials als externe Elektronendonatoren oder -akzeptoren fungieren können (Amano *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2016). Da die Elemente zumeist als einziges die Reaktion im System katalysieren, lassen sich eine Vielzahl neuartiger Anwendungen mit hoher Selektivität und Spezifität umsetzen. Das Anwendungsspektrum umfasst dabei, neben der Aufklärung nativer-biologischer Elektronentransfermechanismen, auch Biosensorik-Applikationen in der medizinischen Diagnostik oder mobilen Lebensmittel- und Umweltproben-Analytik (Golitsch *et al.*, 2013; Gutiérrez-Sanz *et al.*, 2014; Kracher *et al.*, 2016; Verma & Bhardwaj, 2015).

In zweiterer Gruppe findet die Verwendung ganzer mikrobiologischer Organismen statt, die als selbst regenerierende Biokatalysatoren anabole und katabole Prozesse in Wechselwirkung mit einer Elektrode katalysieren (Richter *et al.*, 2012; Wang & Qi, 2013). Grundlage dieser mikrobiellen elektrochemischen Technologie (MET), bildet die Mikroorganismen-Elektroden-Interaktion, die in Abhängigkeit der Anwendung zur Erzeugung oder Speicherung elektrischer Energie dienen kann (Logan & Rabaey, 2012).

1.4.1 Reaktorsysteme für mikrobielle elektrochemische Systeme (MET)

In Abhängigkeit der Anwendung bestehen solche Systeme zumeist aus einer Arbeits- und Gegenelektrode, die in einem Elektrolyt durch einen Separator räumlich voneinander getrennt sein können (Beblawy, 2020). In den meisten Fällen handelt es sich hierbei um Kationenaustauschermembranen, die einen Ladungsausgleich zwischen den beiden Kompartimenten ermöglichen. In den sogenannten 3-Elektrodenaufbauten sind die Systeme um eine Referenzelektrode erweitert, die als fixer Bezugspunkt die externe Kontrolle der elektrochemischen Bedingungen ermöglichen. In der Literatur finden sich eine Vielzahl technischer Ausführungen, die sich von mikrofluidischen Plattformen, zur Untersuchung elektrochemisch aktiver Biofilme, über U-Typ-Zellen, zur Anreicherung exoelektrogener Mikroorganismen, bis hin zu großvolumigen Pilotanlagen für die elektrochemische Abwasserreinigung erstrecken (Isabel San-Martín *et al.*, 2018; Rehnlund *et al.*, 2020; Zuo *et al.*, 2008). Im Folgenden soll eine kurze Übersicht über drei prinzipielle Aufbauten von bioelektrochemischen Systemen und deren Anwendungsspektrum gegeben werden.

Mikrobielle Brennstoffzellen beschreiben Systeme zur Erzeugung elektrischer Energie, resultierend aus der mikrobiellen Oxidation organischer Verbindungen (Potter, 1911; Rozendal *et al.*, 2008). Der grundlegende Aufbau umfasst zumeist ein Zweikammersystem, das räumlich in das anodische und kathodische Kompartiment separiert ist (Abb. 2 A). Im anoxischen Anodenkompartiment erfolgt die mikrobielle Oxidation organischer Kohlenstoffverbindungen, wobei die Elektronen auf den terminalen Elektronenakzeptor – die Anode – übertragen werden. Im Weiteren gelangen die Elektronen durch die Überwindung eines externen elektrischen Verbrauchers zur Kathode, an der wiederum Elektronenakzeptoren wie Sauerstoff, Nitrat oder Sulfat reduziert werden (Logan & Regan, 2006). Unter den dargestellten Aufbauten weisen MFC-Systeme den weitesten technologischen Reifegrad zur kommerziellen bioelektrochemischen Abwasserreinigung auf, was auf ein gesteigertes wissenschaftliches Interesse zurückzuführen ist (McCarty *et al.*, 2011; San-Martín *et al.*, 2018). Nicht zuletzt ermöglicht der simple technische und operative Aufbau solcher Systeme diesen Trend, der sich auch in einem immer breiteren Einsatzgebiet widerspiegelt. Daher haben sich abseits der Abwasserbehandlung etliche weitere Anwendungsbereiche eröffnet, die von der mikrobiellen Wasserentsalzung – zur Erzeugung von teil – bis voll entsalztem Wasser über die Bioremediation – zur Behandlung kontaminierten Böden – entwickelt (Campioni *et al.*, 2018; Cao *et al.*, 2020)

Im Gegensatz zur MFC ermöglicht die sogenannte **Mikrobielle Elektrolysezelle** die abiotische Synthese von Energieträgern wie Wasserstoff, Wasserstoffperoxid oder Methan im anoxischen Kathoden-Kompartiment des Systems (Call & Logan, 2008; Rozendal *et al.*, 2009). Analog zur MFC werden auch hier Elektronen durch einen mikrobiellen Oxidationsprozess bereitgestellt, die im Weiteren einen Teil der Energie für die reduktive Kathodenreaktion bereitstellen (Sleutels *et al.*, 2009). Im Vergleich zur direkten Freisetzung der elektrischen Energie, ermöglichen diese Aufbauten die Speicherung der in den Abfallstoffen enthaltenen Energie (Abb. 2 B). Im Vergleich zur fermentativen Wasserstoffherzeugung (vgl. Abschnitt 1.3), ermöglicht die MEC-Anwendung eine höhere Wasserstoffrückgewinnung, wobei ein breiteres Substratspektrum genutzt werden kann. So zeigen Studien von Cheng und Kollegen (2007), dass unter Verwendung einer Mischkultur für Cellulose eine Wasserstoffausbeute von 63 % und für Glukose 64 % des theoretischen Maximums erreicht werden können.

Die dritte Art der METs, die sogenannten **mikrobiellen Elektrosynthesezellen** ermöglichen die Nutzung anodisch erzeugter elektrischer Energie zum Aufbau höherwertiger Moleküle im kathodischen Kompartiment (Abb. 2 C). Im Vordergrund dieser Anwendung steht die Mikroorganismen-Kathoden-Interaktion, wobei die stromgetriebene Reduktion von CO₂ den Aufbau organischer Verbindungen ermöglicht (Nevin *et al.*, 2011). In Abhängigkeit des verwendeten Biokatalysators können Wertschöpfungsprodukte wie Acetat, Methan oder jüngst auch Biopolymere (PHB) produziert werden (Jung *et al.*, 2021; Nevin *et al.*, 2010; Siegert *et al.*, 2015). Obwohl die mikrobielle Elektrosynthese die jüngste Anwendung aller BES darstellt, wird dieser schon jetzt großes ökologisches und industrielle Potential vorausgesagt, um anfallende Stromüberschüsse aus regenerativer Energiequelle mit der CO₂ Reduktion zu vereinen (Bajracharya *et al.*, 2017; Jung, 2020).

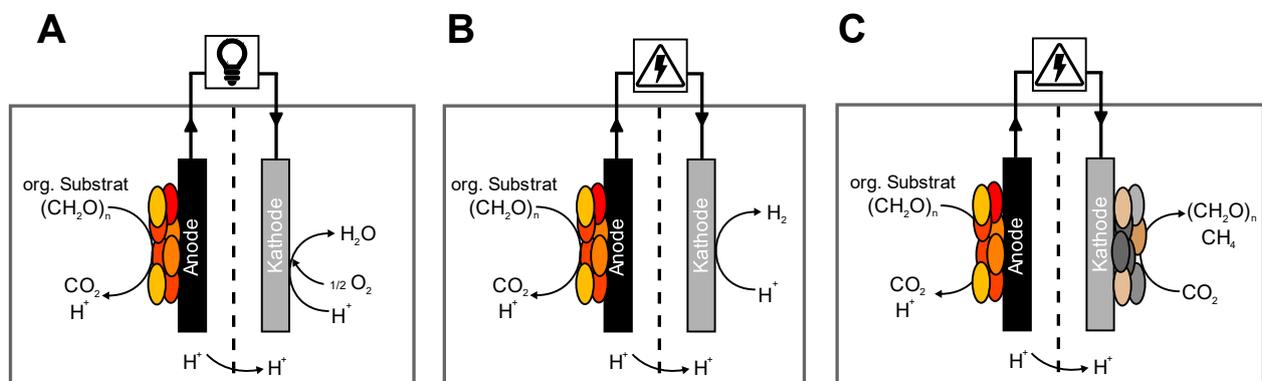


Abb. 2: Schematischer Aufbau der verschiedenen bioelektrochemischen Systeme. Gezeigt ist eine A) mikrobielle Brennstoffzelle, B) mikrobielle Elektrolysezelle und C) mikrobielle Elektrosynthesezelle.

1.4.2 Der extrazelluläre Elektronentransfer in BES

Die Grundvoraussetzung jeder MET, bildet die Mikroorganismen-Elektroden-Interaktion und deren bioelektrodynamische Wechselwirkung. Diese Eigenschaft unterliegt aus struktureller Sicht dem sogenannten extrazellulären Elektronentransfer (EET), wobei der Austausch von Elektronen zwischen dem Zellinnerem und extrazellulär vorliegender Stoffe ermöglicht ist (Gralnick & Newman, 2007).

Den physiologischen Grundsätzen folgend, basiert auch diese Art der Energiegewinnung auf der Oxidation und Reduktion chemischer Verbindungen, wobei Proteine der Elektronentransportkette die Elektronenübertragung eines Elektronendonors negativeren Potentials auf einen Akzeptor positiveren Potentials katalysieren (Fuchs *et al.*, 2017). Die vorliegende Potentialdifferenz ermöglicht den Aufbau eines intrazellulären Protonengradienten, der mittels chemiosmotischer Kopplung zur Erzeugung von Energieäquivalenten (in Form von ATP) und der Zellmotilität dient (Anraku, 1988). Ein Großteil der bekannten Mikroorganismen nutzen dabei lösliche Verbindungen, die intrazellulär einer Redoxreaktion unterzogen werden. Jedoch sind auch eine Reihe anderer Organismen bekannt, die unlösliche Verbindungen wie Mineralien oder Elektroden als Elektronendonator oder -akzeptor nutzen können (Kato, 2016).

Die Grundvoraussetzung bildet der zuvor genannte extrazelluläre Elektronentransport, der zu den ursprünglichsten Formen der Atmung gehört, um abundant unlösliche Elektronenakzeptoren zu nutzen (Richter *et al.*, 2012; Vargas *et al.*, 1998). Vertreter dieser sogenannten dissimilatorischen Eisenreduktion finden sich primär im Phylum der Bacteria, wobei deren breiter physiologischer Bereich (von thermophil, psychrophil über acidophil zu alkaliphil) auf keine spezifische Evolutionslinie hindeutet (Dolch, 2014). Diese als exoelektrogen bezeichneten Organismen finden zumeist Anwendung in mikrobiellen Brennstoffzellen zur Kopplung kataboler Prozesse mit der Reduktion von Anoden. Hingegen werden Organismen, die zur Reduktion eines terminalen Elektronenakzeptors Elektronen von einer Kathode beziehen als elektrotroph bezeichnet. Letztere werden zunehmend in mikrobiellen Elektrosynthesezellen eingesetzt, wobei der Mechanismus zur Elektronenaufnahme noch nicht vollständig aufgeklärt ist (Jung *et al.*, 2021; Reiner *et al.*, 2020). Im Gegensatz dazu ist der Mechanismus exoelektrogener Organismen – der Elektronentransport aus der Zelle auf unlösliche Elektronenakzeptoren – weitestgehend aufgeklärt. Hierbei kann zwischen zwei verschiedenen Elektronentransfermechanismen unterschieden werden, die sich in weitere Mechanismen untergliedern lassen.

Der Weg des **direkten Elektronentransfers** bezeichnet den Elektronentransport durch einen direkten Mikroorganismus-zu-Elektroden-Kontakt (Abb. 3 A), ohne die Anwesenheit mobiler redoxaktiver Mediatoren (Rabaey & Rozendal, 2010). Grundlage dieser verlängerten Elektronentransportkette bilden redoxaktive *c*-Typ Cytochrome, die lokalisiert in verschiedenen Kompartimenten den Elektronentransfer ausgehend von der inneren Membran (Quinonpool) durch das Periplasma über die äußere Membran bis auf terminale Reduktasen der Zelloberfläche ermöglichen. Diese Elektronentransportproteine sind durch mindestens eine prosthethische Häm-*c* Gruppe gekennzeichnet, die mittels Thioetherbindung, ausgehend von zwei Cysteinen, mit dem Proteinrückrad verbunden sind. Die Abfolge der Cysteine ist zumeist stark konserviert und lässt sich anhand der Aminosäuresequenz durch das Auftreten eines CXXCH Motivs identifizieren (Barker & Ferguson, 1999). Die gängigsten Modellorganismen der *c*-Typ Cytochrom vermittelten Anodenatmung stellen das δ -Proteobakterium *Geobacter sulfurreducens* und das γ -Proteobakterium *Shewanella oneidensis* dar. Beide Organismen sind zur dissimilatorischen Eisenreduktion befähigt und weisen eine ungewöhnlich hohe Anzahl potenzieller *c*-Typ Cytochrom-Bindestellen in ihrem Genom auf (Sturm *et al.*, 2012; Weber *et al.*, 2006). Im Falle von *S. oneidensis*, transferieren periplasmatische Cytochrome die Elektronen aus dem Quinonpool auf sogenannte Mtr-Proteine (eng. *metal reducing protein*), welche in der äußeren Membran lokalisiert sind. Die Cytochrome MtrA und MtrC ermöglichen dabei den Transport der Elektronen durch das β -Barrel Protein MtrB, wobei das decahäm Cytochrom MtrC die Elektronen im Folgenden auf terminale Elektronenakzeptoren, wie z.B. Metalloxide oder Anoden, übertragen kann (Pirbadian *et al.*, 2014; Schuetz *et al.*, 2009).

Neben dem direkten physiologischen Kontakt ermöglicht die Ausbildung elektrisch **leitfähiger Zellfortsätze** den Elektronentransport über eine größere Distanz (Abb. 3 B). Sowohl *S. oneidensis* als auch *G. sulfurreducens* sind zur Ausbildung elektrisch leitfähiger Fortsätze befähigt, die entgegen einer analogen Funktion deutlich strukturelle Unterschiede aufweisen. Für *S. oneidensis* wird derzeit eine Ausstülpung des Periplasmas und der äußeren Membran vermutet, wobei unter Beteiligung von Oberflächen-assoziierten *c*-Typ Cytochromen der Elektronentransfer entlang der Elektronenleitung ermöglicht wird (Pirbadian *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2019). Im Gegensatz dazu zeigen aktuelle Studien auf, dass der Elektronentransfer in *G. sulfurreducens* durch die Ausbildung von Typ-IV-Pili Strukturen unter Beteiligung dicht gepackter hexahäm *c*-Typ-Cytochrome ermöglicht ist (Wang *et al.*, 2019).

Im Gegensatz zur direkten Elektronenübertragung ermöglicht der sogenannte **Mediator-basierte Elektronentransfer** den indirekten Elektronentransport über größere Distanzen (Abb. 3 C). Hierbei werden redoxaktive Mediatoren genutzt, welche die Diffusion in den extrazellulären Raum ermöglichen um dort mehrmals reduziert und oxidiert werden zu können. Grundlegend wird hierbei zwischen exo- und endogenen Mediatoren unterschieden, wobei die erstere Gruppe extern lokalisierte Verbindungen wie Sekundärmetaboliten (Huminstoffe, Quinone, Schwefel) oder synthetische Verbindungen (Methylenblau, Benzyl-Vilogoen, ADQS) umfasst (Huang *et al.*, 2018; Roller *et al.*, 2008). Zur zweiten Gruppe gehören Mikroorganismen-eigen-produzierte Stoffe an, wie Phenazine (*Pseudomonas*-Spezies) oder Flavine (*Shewanella*-Spezies), die insbesondere dann produziert werden, wenn der direkte Kontakt zu einem Elektronenakzeptor verwehrt ist (Berger & Rosenbaum, 2017; Von Canstein *et al.*, 2008). Die Zugabe von Mediatoren kann unabhängig des Ursprungs den EET verbessern und sogar nicht-exoelektrogene Organismen zum EET befähigen (Förster *et al.*, 2017; Sturm-Richter *et al.*, 2015).

Der **direkte Interspezies-Elektronentransfer (DIET)** kann als Erweiterung der direkten Elektronenübertragung angesehen werden. Hierbei werden Elektronen ohne die Einwirkung von Mediatoren, Wasserstoff oder Sekundärmetaboliten von einem Donor- auf einen Akzeptor-Organismus übertragen (Abb. 3 D) (Dubé & Guiot, 2015). Der in der Natur zwischen Methanogenen und Exoelektrogenen nachgewiesene Mechanismus erlaubt die Oxidation von Substrat durch den Donorstamm und Reduktion des Akzeptorstammes. Dabei kann die Gesamt-Redoxreaktion durch einen Vertreter vermittelt werden (Rotaru *et al.*, 2014).

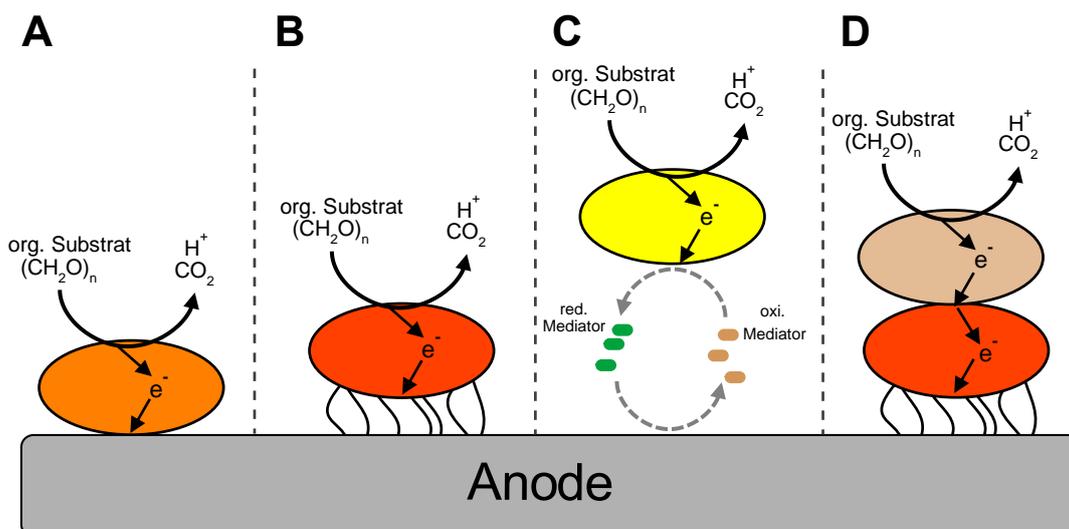


Abb. 3: Extrazellulärer Elektronentransfer auf eine Anode. Dargestellt sind A) der direkte Elektronentransfer, mittels membranständiger Cytochrome, B) der mittels elektrischer Fortsätze direkte Transfer; C) der indirekte Elektronentransfer mittels redoxaktiver rezirkulierender Mediatoren und D) der direkte Interspezies Elektronentransfer.

1.5 Aktueller Stand der petrochemischen Industrie

Zwischen den Jahren 2000 und 2017 hat sich die weltweite Produktionskapazität der chemischen Industrie fast verdoppelt und ist von 1,2 auf 2,3 Mrd. Tonnen angestiegen (UNEP, 2019). Als Ausgangsmaterial dienen noch immer fossile Ressourcen, wobei aktuelle Studien der *International Energy Agency* (IEA) aufzeigen, dass die chemische Industrie jährlich etwa 600 Mil. Tonnen Rohöl und ca. 105 Mrd. Nm³ Erdgas verbraucht. Weitere Zahlen zeigen, dass der Chemiesektor mit jährlich etwa 2 Gigatonnen CO₂ den weltweit drittgrößten Treibhausgasproduzenten bildet (IEA, 2018). In den kommenden Jahren wird jedoch erwartet, dass aufgrund des steigenden Rohölpreises und der strengeren Gesetzgebung – welche das Abfallmanagement und die CO₂-Emissionen betreffen – eine Verlagerung zur bio-basierten Chemieproduktion vorangetrieben wird (Alibardi *et al.*, 2020).

1.5.1 Plattformchemikalien

Der Begriff „Plattformchemikalie“ bezeichnet im weitesten Sinn eine Verbindung, die als Grundbaustein für die Herstellung von strukturell verwandten Fein-/Spezialchemikalien, Polymeren oder anderen hochwertigen chemischen Produkten genutzt werden kann. Die chemischen Charakteristika solcher Moleküle erlaubt die Integration in existierende Prozessrouten, um so eine zukünftige petrochemische Industrie auf Basis weniger Ausgangsstoffe ermöglichen zu können (Jang *et al.*, 2012). Unter dem Aspekten der voranschreitenden Rohstoffverknappung gerät der Fokus daher zunehmend auf die biologische Erzeugung, die auf der Grundlage von Bioraffineriestraßen die Abfallverwertung mit der Erzeugung profitabler Endprodukte vereint (Xiong *et al.*, 2019). Daher definierte das U.S. Energieministerium zu Beginn des Jahrtausends (2004) 30 Verbindungen, die durch eine bio-basierte Kaskadenherstellung Ausgangsstoffe einer zukünftigen petrochemischen Industrie bilden könnten. Die gängigsten Produkte umfassen Alkohole (Methanol, Butanol), kurzkettige organischen Säuren (Acetat, Propionat, Butyrat) oder auch Acetoin. Letzteres dient aufgrund seines butterähnlichen Geruchs als Rohstoff zur Herstellung von Aromen in der Lebensmittelindustrie und darüber hinaus in seiner reduzierten Form (2,3-Butandiol) als Ausgangsstoff der Kautschuk- und Polymersynthese (Haveren *et al.*, 2008; Werpy & Petersen, 2004). Während der jährliche Verbrauch auf etwa 5 - 11 Tonnen geschätzt wird, gehen Erwartungen von einer jährlichen Steigerung von 5,79 % bis zum Jahr 2023 aus (*nxtgen*, 2018). Im Rahmen dieser Arbeit sollte auf Grundlage der löslichen und gasförmigen Hauptbestandteile einer vorangegangenen Dunkelfermentation und bioelektrochemischen Behandlung, Acetoin mit einem in Vorarbeiten etablierten Knallgasbakterium hergestellt werden.

1.5.2 *Cupriavidus necator*

Cupriavidus necator ist ein Gram-negatives, nicht pathogenes Bakterium, das aktuell zur β -Unterklasse der Proteobakterien gezählt wird. Der fakultativ chemolithotrophe Organismus sticht aufgrund seiner metabolischen Vielseitigkeit hervor, die neben einem heterotrophen auch das autotrophe Wachstum umfasst. Der Organismus nutzt als heterotrophe Kohlenstoff- und Energiequelle ein breites Spektrum, das von Ölen über Aromaten bis hin zu organischen Säuren reicht (Raberg *et al.*, 2018). Die Nutzung von Zuckern ist auf Fructose, Gluconat und N-Acetyl-Glucosamin beschränkt und erfolgt über den Entner-Doudoroff-Weg, da das Schlüsselenzym der Glycolyse – die Phosphofruktokinase – fehlt (Pohlmann *et al.*, 2006).

Unter aeroben autotrophen Wachstumsbedingungen dient Wasserstoff als Elektronendonator, Sauerstoff als -akzeptor und CO_2 als Kohlenstoffquelle. Die CO_2 -Fixierung wird über den Calvin-Benson Zyklus beschränkt (CB-Zyklus), der sich funktional in die Carboxylierung, Reduktion und Regeneration unterteilen lässt (Abb. 4, ockerfarbig). Im ersten Schritt addiert das Schlüsselenzym – die Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/-Oxygenase (Rubisco) ein CO_2 Molekül an Ribulose-1,5-Bisphosphat. Das instabile Zwischenintermediat (3-Keto-2-Carboxyarabinitol-1,5-Bisphosphat) zerfällt daraufhin in zwei Moleküle 3-Phosphoglycerat (3-PG). Im zweiten Schritt wird 3-PG unter ATP und NADPH Verbrauch aktiviert und zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) reduziert. Der gebildete Gluconeogenese-Metabolit GAP kann im Weiteren auch dem Aufbau von Kohlenstoffspeichern dienen. Im Ringschluss folgt zuletzt die Regeneration von Ribulose-1,5-Bisphosphat, wobei Fruktose-6-Phosphat, GAP und dessen Isomer Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) im reduktiven Teil des Pentose-Phosphat-Weges umgesetzt werden (Berg *et al.*, 2013). Katalysiert durch eine Transaldolase und Transketolase, entsteht über verschiedene C_3 bis C_7 Phosphat-Intermediate erneut Ribulose-1,5-Bisphosphat.

In Bezug auf die Verwendung von CO_2 als Rohstoff bietet *Cupriavidus necator* durch seine lichtunabhängige CO_2 -Fixierung einen entscheidenden biotechnologischen Vorteil gegenüber der oberflächen-limitierten und lichtabhängigen CO_2 Fixierung in Pflanzen und Cyanobakterien (Windhorst, 2020). In Kombination mit dessen genetischer Zugänglichkeit – die für autotrophe acetogene und methanogene Organismen nicht gegeben ist – ist auch die Integration artifizierlicher Stoffwechselwege möglich. So zeigen eine Vielzahl an Studien die Umwandlung von CO_2 in Produkte wie Isopropanol, Ferulsäure und 3-Methyl-1-Butanol, wobei jüngst auch langkettige Moleküle wie synthetische Lipopolysaccharide erzeugt werden können (Grousseau *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2012; Nangle *et al.*, 2020; Overhage *et al.*, 2002).

Einen weiteren biotechnologisch interessanten Aspekt stellt die PHB-Synthese durch *C. necator* dar. Das Biopolymer gehört der Gruppe der Polyhydroxyalkanoate (PHA) an, welche aufgrund ihrer biologisch abbaubaren Eigenschaft als Kunststoffalternative der Zukunft angesehen werden (Brandon & Criddle, 2019).

Aus physiologischer Sicht dient das Polymer als intrazellulärer Kohlenstoff- und Elektronenspeicher, dessen Akkumulation durch Umweltreize induziert wird (Khanna & Srivastava, 2005). Ausgehend von Acetyl-CoA erfolgt die Synthese in drei Schritten (Abb. 4, hellbraun). Initial kondensiert die β -Kethothiolase zwei Moleküle Acetyl-CoA zu Acetoacetyl-CoA, was im Weiteren durch die Acetoacetyl-CoA Reduktase (PhaB) zu 3-Hydroxybutyryl-CoA reduziert wird. Im abschließenden Schritt wird das Monomer durch die katalytische Wirkung des Schlüsselenzyms PHA-Synthase (PhaC) an das bestehende Polymer verestert. Die Depolymerisierung erfolgt analog - wobei in der ersten Reaktion durch Anlagerung einer CoA-Gruppe eine 3-Hydroxybutyryl-CoA Einheit vom Polymer abgespalten und in einer weiteren Reaktion in Crotonyl-CoA umgewandelt wird. Im Weiteren wird dieses Molekül mittels der β -Oxidation in zwei Moleküle Acetyl-CoA abgebaut und anschließend in den Energiestoffwechsel eingeschleust.

Die PHB-Synthese des in dieser Arbeit verwendeten Produktionsstamms (*C. necator* H16_Δ*acoABC_ΔphaC1_ΔphaC2* pKR*phb-alsSD*) wurde durch die Deletion der beiden PHB-Synthesegene (*phaC1* und *phaC2*, Abb. 4, rot markiert) unterbunden. Der Kohlenstofffluss wurde anschließend über einen heterolog exprimierten Acetoin-Syntheseweg in Richtung Acetoin-Synthese umgelenkt (Abb. 4, gelb). Ausgehend von dem zentralen Stoffwechselbaustein Pyruvat katalysiert die Acetolaktat-Synthase (AlsS) im ersten Schritt die Kondensation zu Acetolaktat, gefolgt von der Decarboxylierung durch die Acetolaktat-Decarboxylase (AlsD) in Acetoin (Abb. 4, gelb). Weitere Modifikationen umfassten die Integration eines wirtseigenen Promoters, der abgeleitet von dem PHB-Regulon, die konstitutive Expression der Acetoin-Synthesegene ermöglichte (Windhorst & Gescher, 2019).

Neben der Nutzung von CO₂ via des CB-Zyklus, ist auch die Metabolisierung von Acetat mittels der Acetat-Kinase (Ack) und Phosphat-Acetattransferase (Pta) möglich (Abb. 4, braun). Auch Butyrat kann via der Butyrat-Kinase (Buk) und Phosphat-Butyryltransferase (Ptb) metabolisiert werden (Abb. 4, blau).

1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, eine innovative bioökonomische Bioraffineriestraße für die bisher unzureichende stoffliche Nutzung biogener Abfallstoffe in höherwertige Produkte zu implementieren. Die Prozessstraße sollte durch die Verschaltung verschiedener technischer und biologischer Module gekennzeichnet sein, wobei schrittweise die Heterogenität des Substrats reduziert und final ein höherwertiges Endprodukt erzeugt werden sollte.

Die Prozessabfolge war durch einen initialen Dunkelfermentationsschritt gekennzeichnet, wobei das hochkomplexe Substratkonvolut in die organischen Säuren Acetat, Propionat und Butyrat konvertiert werden sollte. In der weiteren Abfolge sollte dieser säurehaltige Effluent als Substrat für einen bioelektrochemischen Prozess dienen, wobei spezifisch Acetat und Butyrat mittels anodischer Atmung eliminiert werden sollte. Zur Schließung der Wertschöpfungskette sollte das resultierende anodische Fermentat zusammen mit CO_2 und H_2 der biokatalytischen Acetoin-Synthese dienen.

Als Ausgangssituation stand ein durch Kooperationspartner erzeugter säurehaltiger Dunkelfermentationseffluent zur Verfügung, wobei im Rahmen dieser Arbeit die Etablierung und Optimierung der anodischen Elimination, von Acetat und Butyrat im Fokus stand.

Zum einen sollte eine geeignete Gemeinschaft exoelektrogener Mikroorganismen aus Umweltproben isoliert, angereichert und physiologisch charakterisiert werden, um diese im späteren Verlauf für den anodischen Prozess zu untersuchen. Im Weiteren sollten auch prozesslimitierende Störstoffe mittels verschiedener analytischer Methoden identifiziert werden und durch eine geeignete Prozessstrategie überwunden werden. Anhand einer bereitgestellten bioelektrochemischen Fließzelle sollten die gewonnenen Erkenntnisse zusammengeführt und die anwendungsorientierte Umsetzung anhand verschiedener Evaluationsparameter (DOC, Stromdichte, CE) evaluiert werden. Final sollte ein bereits etablierter Produktionsstamm in Bezug auf dessen Acetoin-Synthese, ausgehend von verschiedenen Prozessszenarien, untersucht und evaluiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Chemikalien und Biochemikalien wurden von Sigma-Aldrich (München), Roth (Karlsruhe), Promega (Mannheim) oder VWR (Darmstadt) bezogen.

2.2 Bakterienstämme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tab. 1 nach ihrer internen Nummer, Bezeichnung, Genotyp und Referenz aufgeführt.

Tab. 1: Verwendete Bakterienstämme und deren genetischer Hintergrund.

Nummer	Bezeichnung	Relevanter Genotyp	Referenz
JG 22	<i>Escherichia coli</i> DH5 α ZI	<i>aciq</i> , PN25- <i>tetR</i> , <i>spR</i> , <i>deoR</i> , <i>supE44</i> , Δ (<i>lacZYAargFV169</i>), Phi80, <i>lacZDM15</i>	(Lutz & Bujard, 1997)
JG 1233	<i>Cupriavidus necator</i> H16_ Δ <i>acoABC</i> _ Δ <i>phaC1</i> _ Δ <i>phaC2</i> pKR <i>phb-alsSD</i>	Δ <i>acoABC</i> , Δ <i>phaC1</i> , Δ <i>phaC2</i> , <i>tcR</i> , <i>mob</i> , RSF1010 ori, <i>par</i> , P <i>phb-alsSD</i>	(Windhorst, 2019)
JG 407	<i>Geobacter sulfurreducens</i> subspecies PCA	Wildtyp	DSM 12127

2.3 Geräte

Die Zentrifugation von Probenmaterial erfolgte mittels der Tischzentrifuge 5418 (Eppendorf, Hamburg), Standzentrifuge Avanti J-26XP (Beckman Coulter, Krefeld) oder ThermoFisher 5810R Zentrifuge (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt). Die Messung der Zelldichte erfolgte durch das Photometer Genesys 20 Spektrophotometer (Thermo Spectronic/ Thermo Fisher Scientific, Darmstadt). Die Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen wurde mithilfe des Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt) und der zugehörigen Software Nanodrop 2000/2000c durchgeführt. Das pH-Meter FE20/EL20 (Mettler Toledo, Gießen) oder pHenomenal pH 1000L (VWR, Darmstadt) wurden zur Bestimmung des pH-Wertes benutzt.

2.4 Oligonukleotide

Die für diese Arbeit genutzten Oligonukleotide sind in Tab. 2 mit ihrer jeweiligen Bezeichnung, Sequenz und Referenz aufgeführt.

Tab. 2: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Primer.

Bezeichnung	Sequenz (5-3')	Referenz
Bacteria_27F	GAGTTTGATCCTGGCTCA	(Rainey <i>et al.</i> , 1994)
Bacteria_1525R	AGAAAGGAGGTGATCCAGCC	
Arch20F	TTCCGGTTGATCCYGCCRG	(Massana <i>et al.</i> , 1997)
A519F	CAGCMGCCGCGGTAA	
341bf	ACACTCTTTCCTACACGACGC TCT TCCGATCTCCTACGGGNGGCWGCAG	Dr. John Vollmer IBG-5, AG-Kaster, KIT
Uni518r	GACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCT TCCGATCTWTTACCGCRGCTGCTGG	

2.5 Medien und Puffer

Die in dieser Arbeit hergestellten Medien und Puffer wurden mit doppelt deionisiertem Wasser (ddH_2O) hergestellt. Die Sterilisation der Kulturmedien und Lösungen erfolgte durch Autoklavieren, wohingegen hitzeempfindliche Medien durch einen $0,2 \mu\text{m}$ Membranfilter sterilisiert wurden. In Tab. 3 ist die Zusammensetzung des LB-Mediums dargestellt, das für die Anzucht und Kultivierung von *Cupriavidus necator* H16 verwendet wurde.

Tab. 3: Zusammensetzung des verwendeten Lysogeny Broth-Medium nach Lennox.

Substanz	Konzentration
Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	5 g/l

Die Anzucht von *Geobacter sulfurreducens* erfolgte in dem in Tab. 4 dargestellten Medium. Die Zusammensetzungen der verwendeten NB-Spurenelement-Lösung und Vitaminlösung sind Tab. 5 und Tab. 6 aufgeführt.

Tab. 4: Zusammensetzung des Anzuchtmediums für *Geobacter sulfurreducens*.

Substanz	Konzentration
KH ₂ PO ₄	0,42 g/l
K ₂ HPO ₄	0,22 g/l
NH ₄ Cl	0,2 g/l
KCl	0,38 g/l
NaCl	0,36 g/l
<i>Geobacter</i> NB-Spurenelemente 100x	10 ml/l
NaHCO ₃	1,81 g/l
Na ₂ CO ₃	0,51 g/l
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	0,21 g/l
Na-Acetat	1,23 g/l
Fumarsäure (nicht für das Anodenmedium)	4,64 g/l
Selenit-Wolframat	1 ml/l
<i>ad</i> 950 ml ddH ₂ O, aufkochen, Begasung mit N ₂ /CO ₂ , autoklavieren. Zugabe von:	
DSMZ 141 Vitaminlösung (100x)	10 ml/l
20 % Hefeextrakt	5 ml/l
Cystein (0,5 M)	2 ml/l
Natrium-Ascorbat (200 mM)	1 ml/l
CaCl ₂ *2 H ₂ O (0,4 M)	1 ml/l
pH auf 7 einstellen, mit anaerober NaOH/HCl (1M), <i>ad</i> 1 l mit ddH ₂ O	

Tab. 5: Zusammensetzung der *Geobacter* NB-Spurenelementlösung (100x).

Substanz	Konzentration
Nitrilotriessigsäure	2,14 g/l
<i>ad</i> 500 ml mit ddH ₂ O, pH-Wert auf 6,5 mit KOH einstellen. Zugabe von:	
MnCl ₂ * 4 H ₂ O	0,1 g/l
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	0,3 g/l
CoCl ₂ * 6 H ₂ O	0,17 g/l
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	0,2 g/l
CuCl ₂ * 2 H ₂ O	0,3 g/l
AlK(SO ₄) ₂ *12 H ₂ O	0,005 g/l
H ₃ BO ₃	0,005 g/l
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	0,11 g/l
NiSO ₄ * 6 H ₂ O	0,11 g/l
Na ₂ WO ₄ * 2 H ₂ O	0,2 g/l

Tab. 6: Zusammensetzung der DSMZ-141 Vitaminlösung (100x).

Substanz	Konzentration
Biotin	2 mg/l
Pyridoxin-HCl	10 mg/l
Thiamin-HCl	5 mg/l
Riboflavin	5 mg/l
Nicotinsäure	5 mg/l
DL-Ca-Pantothenat	5 mg/l
Vitamin B12	0,1 mg/l
P-Aminobenzoesäure	5 mg/l
Liponsäure	5 mg/l
Biotin	2 mg/l
Folsäure	2 mg/l

Das verwendete Waschmedium zur Vorbereitung der Kulturen ist in Tab. 7 aufgeführt.

Tab. 7: Zusammensetzung des Waschmediums für *Geobacter sulfurreducens*.

Substanz	Konzentration
KH ₂ PO ₄	0,42 g/l
K ₂ HPO ₄	0,22 g/l
NH ₄ Cl	0,20 g/l
KCl	0,38 g/l
NaCl	0,36 g/l
NaHCO ₃	1,81 g/l
Na ₂ CO ₃	0,51 g/l
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	0,21 g/l
Selenit-Wolframat	1 ml/l
<i>ad</i> 950 ml ddH ₂ O, aufkochen, N ₂ /CO ₂ -Begasung, autoklavieren. Zugabe von:	
CaCl ₂ * 2 H ₂ O (0,4 M)	1 ml/l
pH-Wert auf 7 einstellen, mit anaerober NaOH/HCl (1M), <i>ad</i> 1 l mit ddH ₂ O	

Das Medium zur Anreicherung des exoelektrogenen butyrat-oxidierendem Konsortiums ist in Tab. 8 dargestellt. Die dazu verwendete Vitaminlösung in Tab. 9.

Tab. 8: Anodenmedium für die Anreicherung exoelektrogener Mikroorganismen.

Substanz	Konzentration
KH ₂ PO ₄	0,42 g/l
K ₂ HPO ₄	0,22 g/l
NH ₄ Cl	0,2 g/l
KCl	0,38 g/l
Butyrat	1,1 g/l
NaCl	0,36 g/l
NaHCO ₃	1,81 g/l
Na ₂ CO ₃	0,51 g/l
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	0,21 g/l
Selenit-Wolframat	1 ml/l
<i>ad</i> 950 ml _{dd} H ₂ O, aufkochen, N ₂ /CO ₂ -Begasung, autoklavieren. Zugabe von:	
DSMZ 503 7-Vitaminlösung (100x)	10 ml/l
CaCl ₂ *2 H ₂ O (0,4 M)	1 ml/l
pH auf 7 einstellen, mit anaerober NaOH/HCl (1M)	

Tab. 9: Zusammensetzung der 7-Vitaminlösung (100x) nach DSMZ-141.

Substanz	Konzentration
Vitamin B12	0,1 mg/l
Biotin	2 mg/l
Pyridoxin-HCl	10 mg/l
Nicotinsäure	5 mg/l
DL-Ca-Pantothenat	5 mg/l
P-Aminobenzoensäure	8 mg/l
Liponsäure	5 mg/l

2.6 Prozesssubstrat für das bioelektrochemische System

Das in dieser Arbeit verwendete Hydrolysat stammte aus einer projektübergreifenden Zusammenarbeit mit Frau Dr. Rowayda Ali unter der Leitung von Prof. Harald Horn (Wasserchemie, Engler-Bunte-Institut, KIT Karlsruhe). Der Hydrolyse-Prozess wurde in einem 10 l Fermenter bei 30 °C und einem pH von 6 durchgeführt (Ali *et al.*, 2020). Im Zuge der täglichen Nachfütterung wurde je 1 l der Prozessflüssigkeit aus dem Reaktor mit 1 l frischen Substrat ausgetauscht. Die so erhaltene Prozessflüssigkeit wurde anschließend gesammelt und für die weitere Bearbeitung bereitgestellt. Bis zur Weiterverwendung wurde die Flüssigkeit in gasdicht verschlossenen Flaschen lichtgeschützt bei 4 °C gelagert. Zur experimentellen Verwendung der Prozessflüssigkeit wurde in einem ersten Zentrifugationsschritt die Flüssigkeit von der Festphase getrennt (9500 x g, 60 min bei 4 °C). Die Entfernung von kleineren Partikeln erfolgte durch aufeinanderfolgende Vakuumfiltrationsschritte im 1, 0,45 und 0,2 µm Maßstab. Schwebepartikel wurden mithilfe einer SpectrumLabs Crossflow-Apparatur (KrosFlo Research Iii TFF System, San Francisco, USA) unter Verwendung eines Crossflow-Moduls mit einer Porengröße von 0,2 µm (D02-E20U-05-N oder D02-E001-05-S) entfernt. Die finale Behandlung des Filtrats erfolgte mittels einer Überdruckfiltration (0,2 µm Membranfilter) in eine anoxische Flasche.

2.7 Produktionsstamm Acetoin

Die hetero- und mixotrophen Versuchsreihen mit *C. necator* H16_Δ*acoABC*_Δ*phaC1*_Δ*phaC2* pKR*phb-alsSD* wurde in Minimal-Medium 81 (Mineral medium for chemolithotrophic growth H-3, DSMZ) durchgeführt (Tab. 10). Die in Tab. 11 gelisteten Lösungen wurden separat hergestellt und unter sterilen Bedingungen nach dem Verhältnis aus Tab. 10 zusammengeführt. In Abhängigkeit des Anwendungszwecks wurde das Medium mit Acetat, Butyrat oder Propionat als Kohlenstoffquelle ergänzt. In allen Ansätzen wurde Tetracyclin zu 15 µg/ml (finale Konzentration) zugegeben.

Tab. 10: Zusammensetzung Mineral Medium für chemolithotrophes Wachstums nach DSMZ 81.

Lösung	Volumen für 1 l
10x Lösung B	100 ml
25x Phosphat-Puffer	40 ml
100x FeNH ₄ -Citrat-Lösung	10 ml
100x NaHCO ₃ -Lösung	10 ml
200x Vitamin-Lösung	5 ml

Tab. 11: Zusammensetzung der in Tab. 10 verwendeten Komplementierungslösungen.

10x Lösung B	
Substanz	Menge für 1 l
NH ₄ Cl	10 g
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	5 g
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	0,1 g
MnCl ₂ * 4 H ₂ O	0,05 g
NaVO ₃ * H ₂ O	0,05 g
Spurenelemente SL-6	50 ml
25x Phosphat-Puffer	
Substanz	Menge für 1 l
KH ₂ PO ₄	5,75 g
Na ₂ HPO ₄ * H ₂ O	7,25 g
100x FeNH₄-Citrat	
Substanz	Menge für 1 l
FeNH ₄ -Citrat	5 g/l
100x NaHCO₃-Lösung	
Substanz	Menge für 1 l
NaHCO ₃	5 g
200x Vitamin-Lösung	
Substanz	Menge für 1 l
Riboflavin	100 mg
Thiamin-HCl * 2 H ₂ O	500 mg
Nicotinsäure	500 mg
Pyridoxin-HCl	500 mg
Ca-Pantothenat	500 mg
Biotin	1 mg
Folsäure	2 mg
Vitamin B12	10 mg
Spurenelemente-Lösung SL-6	
Substanz	Menge für 1 l
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	0,1 g
MnCl ₂ * 4 H ₂ O	0,03 g
H ₃ BO ₄	0,3 g
CoCl ₂ * 6 H ₂ O	0,2 g
CuCl ₂ * 2 H ₂ O	0,01 g
NiCl ₂ * 6 H ₂ O	0,02 g
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	0,03 g

2.8 Kultivierung von Bakterienstämmen

2.8.1 *Geobacter sulfurreducens* PCA

Die Anzucht einer Starterkultur von *G. sulfurreducens* erfolgte im Tab. 4 aufgeführten Medium bei 30 °C im Brutschrank. Im 3 bis 4 Tageszyklus wurde die Gasphase gegen eine neue N₂/CO₂-Phase getauscht. Nach der Anzucht (3 bis 7 Tage, OD₆₀₀ ca. 0,6) wurde die Kultur für 7 min bei 6000 g und 4 °C zentrifugiert, mit Waschmedium gewaschen (Tab. 7, 2x 6000 g, 7 min bei 4 °C) und im Anschluss in dem jeweiligen Kulturmedium resuspendiert. Die in dieser Arbeit vorgestellten Wachstumsexperimente erfolgten in 50 ml Kulturmedium unter anoxischen Bedingungen. Die Kultivierung im bioelektrochemischen System erfolgte mit dem in Tab. 8 aufgeführten Medium, bei 30 °C und einer konstanten N₂/CO₂-Begasung. Die Prozessparameter und Einstellungen der bioelektrochemischen Kultivierung sind in Abschnitt 2.15 aufgeführt. Falls nicht anders erwähnt, wurden die Systeme mit einer OD₆₀₀ von 0,1 beimpft.

2.8.2 *C. necator* H16_Δ*acoABC_ΔphaC1_ΔphaC2* pKR*phb-alsSD*

Die Experimente mit dem Produktionsstamm *C. necator* H16_Δ*acoABC_ΔphaC1_ΔphaC2* pKR*phb-alsSD* erfolgten standardgemäß mit dem in Tab. 10 aufgeführten Minimalmedium. Die Kultivierung erfolgte sowohl unter hetero- als auch mixotrophen Bedingungen in 50 ml Kulturvolumen. Je nach Untersuchungszweck wurden Acetat, Butyrat und/oder Propionat als Kohlenstoffquelle beigelegt. Die heterotrophen Experimente wurden in 500 ml Erlenmeyer-Kolben durchgeführt, während die mixotrophe Versuchsreihe in, mit gasdichten Stopfen verschlossenen, 1 l Flaschen erfolgte. Anschließend wurde die Gasphase mittels Vakuumpumpe entzogen und nachfolgend mit einer 80 % H₂, 5 % CO₂ und 15 % O₂ Gasmischung über 4 Stunden befüllt. Nach dem experimentellen Beginn erfolgte der Druckausgleich auf atmosphärischen Druck durch sterile Umgebungsluft (Windhorst & Gescher, 2019).

2.9 Konservierung von Bakterienstämmen

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme wurden als Gefrierkultur konserviert. Die entsprechende Kultur wurde in der Wachstumsphase geerntet und anschließend mit Glycerin (finale Konzentration 10 %) versetzt. Durch die unmittelbare „Schockgefrierung“ in Flüssigstickstoff konnte eine stabile Lagerung bei -80 °C gewährleistet werden. Zur Rekultivierung wurden die Stämme unter sterilen Bedingungen je nach Anwendungszweck auf LB-Platten ausgestrichen oder in Flüssigmedium überführt.

2.10 Gewinnung und Aufreinigung von Nukleinsäuren

2.10.1 Präparation von genomischer DNA

Die Isolation genomischer DNA (gDNA) für die 16S-rDNA Diversitäts- und Metagenom-Analyse wurde mittels des *DNeasy PowerBiofilm* Kit (Qiagen) nach Herstellerangabe durchgeführt. Die Zellernte erfolgte in der anoxischen Kammer. Dafür dienten sowohl 2 ml pelletierte planktonische Phase als auch ein ca. 1,75 cm² großes Elektrodenstück als Ausgangsmaterial. Das planktonische Pellet wurde direkt verwendet, während das Elektrodenmaterial vor Protokollbeginn weiter zerkleinert wurde. Den Herstellerangaben folgend wurde die Konzentration und Reinheit der isolierten gDNA photometrisch bestimmt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

2.10.2 Präparation von gesamt RNA

Zum Zeitpunkt der Probenmaterialernte wurden 2 ml pelletierte planktonische Phase und ein ca. 1,75 cm² großes Elektrodenstück mit je 1 ml RNAProtect versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt. Die Isolation der RNA erfolgte mittels *RNeasy PowerBiofilm* Kit (Qiagen) unter RNase freien Bedingungen. Die Konzentration und Reinheit der isolierten RNA wurde photometrisch überprüft. Zur weiteren Qualitätskontrolle der RNA und zur Untersuchung auf DNA-Rückstände wurde eine PCR durchgeführt. Hierzu wurde 1 µl der isolierten RNA in einem 15 µl MangoMix-Ansatz mit den Primern Bacteria_27F und Bacteria_1525R (Tab. 2) versetzt. Als Positivkontrolle diente eine *E. coli* K12 Kolonie und als Negativkontrolle, Nuklease-freies Wasser. In Tab. 12 ist das für den Nachweis von DNA-Kontaminationen verwendete PCR-Programm dargestellt. Die PCR-Reaktionen wurden anschließend einer qualitativen Gelelektrophorese unterzogen. Gegebenenfalls wurde der DNase I-Verdau wiederholt, bis keine DNA in den RNA-Proben mehr nachgewiesen werden konnte.

Tab. 12: PCR-Programm zur Detektion von DNA-Verunreinigungen.

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95 °C	2:30 min
Denaturierung	95 °C	0:40 min
Anlagerung für Primer	51 °C	0:40 min
Elongation	72 °C	0:40 min
Finale Elongation	72 °C	5 min
Kühlen	4 °C	

2.11 Genetische Methoden

2.11.1 Polymerase Kettenreaktion

Die Amplifikation der genomischen DNA, welche für die 16S-rDNA-Gen-Amplikon-Sequenzierung isoliert wurde, erfolgte durch eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit den Primern 341bf und Uni518r. Für qualitative Ansätze wurde die DNA mit der Q5 *High-Fidelity* Polymerase nach Herstellerangabe in 25 μ l Ansätzen amplifiziert. Die quantitative Amplifikation von Fragmenten erfolgte mittels Mango Mix (Bioline, Lickenwald) in 15 μ l Ansätzen. Die Zusammensetzung der jeweils verwendeten Ansätze und der zugehörigen PCR-Protokolle sind in Tab. 13 und Tab. 14 dargestellt. Die Durchführung der Reaktionen erfolgte mittels der C1000 oder S1000 MjMini Thermocycler (BioRad, München) nach den jeweiligen Einstellungen.

Tab. 13: Zusammensetzung der Mango-Mix und HiFi Q5 Reaktionsansätze.

Komponente	Mango-Mix	HiFi Q5 DNA-Polymerase
Mastermix	7,5 μ l	-
Puffer	-	5 μ l
dNTPS (10mM)		0,5 μ l
<i>Forward</i> -Primer (10 mM)	0,75 μ l	1,25 μ l
<i>Reverse</i> -Primer (10 mM)	0,75 μ l	1,25 μ l
Polymerase	-	0,25 μ l
5x GC-Enhancer		5 μ l
Template	100 ng	100–300 ng
ddH ₂ O	ad 15 μ l	ad 25 μ l

Tab. 14: PCR-Programme für die verwendeten MangoMix und HiFiQ5-Ansätze.

Schritt	Mango-Mix		HiFi Q5 DNA-Polymerase	
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	95 °C	2 min
Denaturierung	95 °C	0:30 min	95 °C	0:40 min
Anlagerung für Primer (Gradient)	55-60 °C	0:40 min	56-52 °C	0:40 min
Elongation	72 °C	0:30 min	72 °C	0:40 min
Finale Elongation	72 °C	10 min	72 °C	5 min
Kühlen	12 °C	∞	12 °C	∞

2.11.2 Gelelektrophorese

Die Auftrennung der PCR-Amplifikation erfolgte durch die Gel-Elektrophorese. Hierbei wurden 1 %-ige Agarosegele genutzt, die während der Herstellung mit 5 ppm Midori Green versetzt wurden. Nach der Aushärtung wurden die Gele in eine mit TAE-Puffer gefüllte Gel-Kammer (Powerpack Universal, BioRad, München) überführt und die mit Ladepuffer versetzten Probe in die Ladetaschen geladen. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 120-140 V über ca. 30 min. Standardmäßig diente ein 1 kB DNA-Marker (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt) als Größenmarker. Nach einer qualitativen Kontrolle erfolgte der Ausschnitt einzelner DNA-Fragmente aus dem Gel. Die Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des *Wizard Plus SV Gel and PCR Clean-up Kit* (Promega, Mannheim).

2.12 Quantifizierung von DNA und RNA

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten DNA und RNA erfolgte photometrisch mittels eines Nanodrop-Photometers (Abschnitt 2.3). Standardmäßig wurde 1 µl der Probe vermessen, wobei der jeweilige Elutionspuffer als Referenzwert diente. Als Qualitätsmerkmal der isolierten DNA oder RNA wurden die jeweiligen Verhältnisse der bei 230, 260 und 280 nm gemessenen Absorptionen herangezogen.

2.13 Sequenzierungen

2.13.1 Sanger-Sequenzierung – Kettenabbruchmethode

Nach der erfolgreichen Präparation von genetischem Material wurde die Sequenz mittels der Sanger-Kettenabbruchmethode überprüft. Die Sequenzierung erfolgte extern durch die Firma Eurofins Genomics (Ebersberg) (mix2Seq overnight Kit).

2.13.2 Illumina-Sequenzierung

Im Rahmen der phylogenetischen und physiologischen Charakterisierung der in Abschnitt 3.1 beschriebenen butyrat-oxidierenden mikrobiellen Gemeinschaft wurde auf die Illumina-Sequenzierung zurückgegriffen. Sowohl die Analyse der mikrobiellen Diversität (16S-rDNA- Amplikon-Sequenzierung) als auch die Metagenom- und Metatranskriptom-Analyse erfolgte mit Hilfe der Illumina NextSeq 550 Plattform (2x150 bp *reads*) und des High Output Kits V 2.5 (150 Zyklen). Das Probenmaterial der in Abschnitt 3.1.5 vorgestellten Triplikate (7. Transfergeneration) wurde für die nachfolgende Prozessierung zu je gleichen Mengen gepoolt (sowohl isolierte gesamte DNA als auch RNA).

Die Erstellung der Sequenzbibliothek und Sequenzierung wurde am Institut für biologische Grenzflächen (IBG 5, AG Kaster, KIT Karlsruhe) unter der Leitung von Prof. Ann-Kathrin Kaster, durch Herrn Dr. John Vollmer und Morgan Sobol durchgeführt. Die Erstellung der Metagenom-Sequenzbibliotheken wurde mithilfe des NEBNext Ultra™ II FS DNA Library Prep Kit (New England Biolabs, Frankfurt am Main) durchgeführt.

2.14 Bioinformatische Auswertung

2.14.1 16S-rDNA-Gen-Amplikon-Sequenzierung

Die Prozessierung der 16S-rDNA-Amplikon-Sequenzierung erfolgte mithilfe der *CLC genomics workbench* (Version 12.5, CLC bio, Aarhus, Denmark) unter Verwendung des Microbial Genomic Plugins (Version 4.0, Qiagen, Hilden). Die Auswertung wurde nach einem vom Hersteller (vor)implementierten Arbeitsablauf (OTU Clustering CLC) durchgeführt. Hierbei wurde für die ersten drei Schritte (*Adapter-trimming*, *reads-merging* und *reads-trimming*) auf Standardeinstellungen zurückgegriffen. Das anschließende *operational taxonomic unit clustering* (OTU-clustering) wurde unter Voraussetzung einer 97 %-igen Verwandtschaft durchgeführt. Dabei erfolgte die Zusammenfassung von *reads* zu sogenannten Clustern, wobei jeder *read* eine Ähnlichkeit von mindestens 97 % zu jedem anderen Mitglied des Clusters aufweisen musste. Der Abgleich dieser Cluster mit der SILVA 16s v 128 Datenbank ermöglichte die phylogenetische Zuordnung der OTUs. Die Identifikation und Herausfilterung sogenannter Chimären (Artefakte der PCR-Amplifikation) erfolgte parallel. Im letzten Schritt wurden OTU-Cluster entfernt, welche über alle Generationen hinweg eine geringere Abundanz als 10 *reads* aufwiesen.

2.14.2 Metagenom-/Metatranskriptom-Analyse

Die Auswertung der in dieser Arbeit vorgestellten Metagenom und -transkriptom Datensätze erfolgte mittels der Kommandozeilen-basierten *SqueezeMeta* Pipeline (Tamames & Puentes-Sánchez, 2019). Ähnlich der zuvor vorgestellten 16S-rDNA-Diversitätsanalyse folgt die Pipeline aufeinanderfolgenden Arbeitsschritten, die eine effiziente, vergleichbare und valide Auswertung ermöglichen.

In den folgenden Abschnitten werden die aufeinander aufbauenden Schritte und deren Prozessierungsmethoden näher erläutert. Falls nicht anders genannt, wurde der *merged mode* benutzt und auf voreingestellte Standardeinstellungen zurückgegriffen.

Prozessierung der Rohsequenzen

Im ersten Schritt erfolgte die Filterung der Rohsequenzen (*reads*) nach ihrer Qualität, sowie die Entfernung noch vorhandener Adapter-Sequenzen. Prozessiert durch Trimmomatic (v 0.39) (Bolger *et al.*, 2014) mit den Einstellungen LEADING: 8 TRAILING: 8 SLIDINGWINDOW: 10:15 MINLEN: 30 wurden die prozessierten *reads* anschließend zu paired-end-*reads* vereinigt.

Assemblierung und Gen-Identifikation

Die Assemblierung der prozessierten *reads* zu längeren Fragmenten (sog. *contigs*) wurde durch Megahit (Li *et al.*, 2015) bewerkstelligt. Mit einem k-mer Umfang von 21 - 99 und einer Schrittgröße von 20 erfolgte die individuelle Assemblierung jeder Metagenomprobe. Eine Besonderheit der SqueezeMeta Pipeline bildet der erneute Zuordnungsversuch zuvor nicht zugeordneter *contigs*. Prozessiert durch Minimus 2 (Treangen *et al.*, 2011) werden die *contigs* oder *reads* erneut mit bereits assemblierten *contigs* re-assembliert, um Überhänge mit einer globalen Identität von > 99 % zu finden. Falls es zu keiner Zuordnung in der eigenen Probe kommt, werden überlappende Bereiche für dasselbe Genome in anderen Proben initiiert, um die Vervollständigung des Genoms zu erreichen. Um die Qualität des Metagenoms entscheidend zu verbessern, wurden *contigs*, die über mehrere Runden nicht zugeordnet wurden oder eine Größe ≤ 150 bp besitzen, mittels prinseq aus dem Pool entfernt (Schmieder & Edwards, 2011). Die anschließende Identifikation/Vorhersage codierender Bereiche und ribosomaler RNA Gene wurde mit den Tools Prodigal (v 2.6.1) (Hyatt *et al.*, 2010) und barnap (Seemann, 2014) durchgeführt. Die taxonomische Klassifizierung der identifizierten 16S-rDNA Sequenzen erfolgte durch den RDP *classifier* (Wang *et al.*, 2007).

Homologie Suche und Annotation

Die Annotation der identifizierten Gene erfolgte unter Verwendung des Diamond-Softwarepaketes (v 0.8.14) (Buchfink *et al.*, 2014). Hierbei dienen die zuvor identifizierten codierenden Genbereiche als Abfrageparameter taxonomischer und funktioneller Datenbanken. In den folgenden drei Abschnitten sind die für die Zuordnungen verwendeten Datenbanken und ihre spezifische Prozessierung näher beschrieben.

Taxonomische Zuordnung und Mapping

Die taxonomische Zuordnung der identifizierten CDS erfolgte unter Verwendung eines für SqueezeMeta eigens entwickelten Last Common Ancestor (LCA) Algorithmus. Hierbei fungiert die translatierte CDS als Abfrageparameter für die GenBank nr *database*, die wöchentlich aktualisiert wird.

Unter Verwendung eines *e-value cut-off* von $1e^{-3}$ wird dabei der beste Treffer, gefolgt von Treffern mit mind. 80 % *bitscore* und weniger als 10 % des ursprünglichen *identity-scores* (best-hit Methode) ausgewählt. Der LCA vergleicht den letzten gemeinsamen Vorgänger (Taxon), der in allen Treffern (noch) vertreten ist und legt diesen als taxonomische Annotation für das Gen fest. Die dabei streng gewählten *cut-off* Identitätswerte, ermöglichen, dass Treffer einen Mindestwert für die Abfrageidentität aufweisen, um die Zuweisung zu einem bestimmten taxonomischen Rang zu erreichen. Die Schwellenwerte sind dabei nach Luo *et al.*, 2014 definiert und geben eine 85, 60, 55, 50, 46, 42 %-ige Identität für die Zuordnung von Arten, Gattung, Familie, Ordnung, Klasse, Phylum vor. Schwellenwerte darunter führen zu keiner Zuordnung. Eine weitere Maßnahme für die effiziente taxonomischen Zuordnung bildet der Vergleich der auf dem *contig* lokalisierten Gene und deren taxonomischer Zuordnungen in der Summe. Ein *contig* wird mit dem Taxon versehen, zu dem die meisten seiner Gene gehören. Als Evaluationsmaß wird dabei der Disparitätswert berechnet, der angibt, wie viele Gene nicht mit dem *consens* übereinstimmen. *Contigs* mit einer Disparität > 2 % werden für die nachfolgenden Analysen ausgeschlossen. Der Einbezug dieser Schwellenwerte, sowohl für einzelne Gene als auch *contigs*, garantiert dabei, dass es zu keiner Zuordnung schwacher oder nicht schlüssiger Treffer kommt.

Funktionale Zuordnung

Die funktionale Annotation der identifizierten Gene erfolgte durch einen Protein-Protein-Blast mit der eggNOG (Huerta-Cepas *et al.*, 2016) und der KEGG-Datenbank (Kanehisa & Goto, 2000). Der dabei verwendete *fun3*-Algorithmus vergleicht die Ausgaben der beiden Datenbanken und wählt die ersten Treffer, welche den Identitätsschwellenwert für jedes COG oder KEGG Ergebnis überschreiten. Die resultierenden *bitscores* werden dabei gemittelt und der höchst bewerteten COG- oder KEGG-Annotation zugeordnet, deren Punktzahl alle anderen um 20 % übertrifft. Dieses Verfahren verhindert die Annotation widersprüchlicher Gene mit einer Verwandtschaft oder Ähnlichkeit von mehr als einer Proteinfamilie. Falls es zu keiner Überschreitung des Schwellenwertes kommt, werden die identifizierten Bereiche nicht annotiert. Neben der funktionalen Zuordnung erfolgte eine weitere Zuordnung durch die Identifikation von Proteindomänen mittels der PFAM-Datenbank, prozessiert durch das HMMER3 *tool* (Eddy, 2009).

Binning, Taxonomische Zuordnung der Bins und Verunreinigung

Die Einordnung der erhaltenen *contigs* in Genom-Bins wurde unter Einbezug der Binning-Algorithmen, Maxbin (Wu *et al.*, 2016), Metabat2 (Kang *et al.*, 2015) und DAS Tool (Sieber *et al.*, 2018) bewerkstelligt.

Im Allgemeinen klassifizieren Binning-Algorithmen *contigs*, welche sowohl eine ähnliche Nukleotid-Zusammensetzung als auch Coverage-Information aufweisen, um diese in individuelle Genom-Bins zu sortieren. Die taxonomische Zuordnung der Bins erfolgte ähnlich der zuvor beschriebenen taxonomischen Zuordnung von Genen, wobei das Taxon, welches durch die meisten *contigs* vertreten ist, annotiert wird. Abschließend erfolgte die Evaluation jedes Bins nach seiner Genomvollständigkeit, Abdeckung und seinem Kontaminationsgehalt durch CheckM (Parks *et al.*, 2015). Bins welche eine Vollständigkeit < 10 % aufwiesen, wurden aus der Analyse ausgeschlossen.

Mapping-Methode & Statistiken

Die Bestimmung der Häufigkeit jedes Gens in den Proben erfolgt durch das *mapping* der prozessierten *reads* auf die jeweiligen *contigs* (Bowtie2, Langmead & Salzberg). Die Bestimmung der *raw-counts*, der Gen-Abdeckung der normalisierte RPKM- und TPM-Werte erfolgte mittels des BEDtools (Quinlan & Hall, 2010).

2.15 Elektrochemische Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Drei-Elektroden-Messaufbau verwendet. Der Messaufbau besteht aus einer Arbeitselektrode (WE), Referenzelektrode (RE) und Gegenelektrode (CE), wobei das Potential der Arbeitselektrode relativ zu der RE mittels eines Potentionstaten reguliert wird. Zur Erhaltung des Potentials über den Messzeitraum wird entsprechend ein Elektronenüberschuss oder -mangel an der Gegenelektrode generiert. Standardgemäß wurde mit einem Arbeitselektrodenpotential von 0 mV vs. SHE gearbeitet, unter Verwendung einer in KCl gesättigten Silber/Silberchlorid-Referenzelektrode (-199 mV vs. SHE) (Sensortechnik Meinsberg, Waldheim). Die Durchführung der in Abschnitt 3.1 beschriebenen Anreicherung erfolgte nach dem chronoamperometrischen Messprinzip. Im Allgemeinen beschreibt die Chronoamperometrie eine elektrochemische Methode, bei der die Arbeitselektrode mit einem konstanten Potential beschickt und deren resultierender Elektronentransport (aus Oxidations- oder Reduktionsprozessen) über den experimentellen Verlauf gemessen wird.

In dieser Arbeit wurde die Arbeitselektrode als Anode und die Gegenelektrode als Kathode verwendet. Die Aufzeichnung der durch die Substratoxidation übertragenen Elektronen erfolgte unter Verwendung des Mehrkanalpotentiostat 6 EmStat3 (PalmSens BV, Randhoev, Niederlande). Der Aufzeichnungszeitraum variierte individuell, wobei jedoch alle 60 s ein Messwert aufgezeichnet wurde (Multi Trace Software, PalmSens BV, Randhoeve, Niederlande).

2.15.1 System nach Golitsch, 2016

Das in dieser Arbeit genutzte System wurde in Vorarbeiten von Golitsch F., (2016) entwickelt und charakterisiert. Das System besteht aus einem aus Polycarbonat gefertigten Deckel und Bodenteil, das ein Batterieglas von 270 ml einspannt. Die Zugänge der Begasung, Beprobung und Elektrodentechnik befinden sich im Deckel des Systems und sind aus PTFE und Polyamid gefertigt. Die 36 cm² große Arbeitselektrode (Graphitvlies, SIGRACELL®Carbon, GFD 2,5 EA, SGL Group; Wiesbaden) ist horizontal in einer PTFE-Vorrichtung eingespannt und von einer Edelstahlkanüle als Anschlussstelle zur Außenseite durchdrungen. Das Gegenelektrodenkompartiment besteht aus einem im PTFE-Halter eingespanntem 1,25 cm² Platinnetz (104 Maschen/cm², Chempur, Karlsruhe), das weiterhin in einem PTFE-Gegenelektrodenhalter verankert ist. Der schematische Aufbau des Systems ist Abb. 5 zu entnehmen.

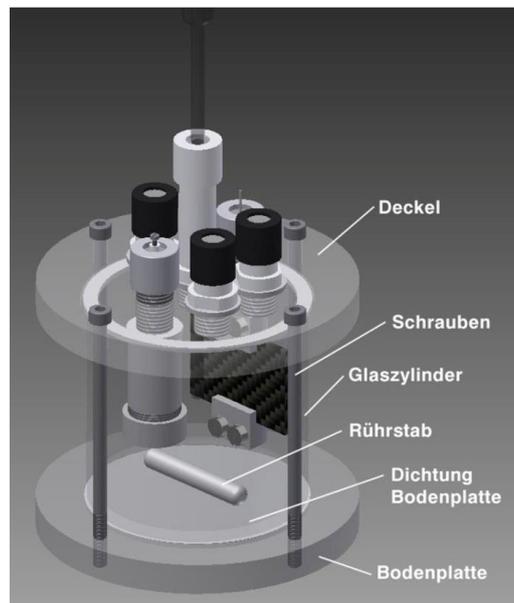


Abb. 5: Aufbau des bioelektrochemischen Systems nach Golitsch, 2016. Das System besteht aus zwei Kammern und wurde im Drei-Elektroden-Setup verwendet.

In Abhängigkeit des Versuchsaufbaus wurde eine Protonenaustauschermembran (Fumapem F-950, Fumatech, Bietigheim-Bissingen) in das Gegenelektrodenkompartiment eingespannt. Die als Substrat verwendeten Medien sind in Abschnitt 2.5 und 2.6 aufgelistet. Im Weiteren wurde auf eine permanente N₂/CO₂-Begasung zurückgegriffen, um ein anoxisches Milieu zu gewährleisten.

2.15.2 Flat-Plate-Cell System (FPC System)

Die Evaluierung des in Abschnitt 3.5 vorgestellten Langzeitexperimentes erfolgte in einem durch die Gruppe von Prof. Sven Kerzenmacher (AG Kerzenmacher, Fachgebiet Umweltverfahrenstechnik Universität Bremen) konzipierten System. Die kompakte Bauweise in Kombination mit einem erhöhten Verhältnis zwischen Elektrodenoberflächen und Reaktionsvolumen ermöglichte so die biotechnologische Evaluierung wichtiger Rahmenparameter in Bezug auf die anodische Elimination im zirkulierenden Betriebszustand. Das sogenannte *Flate-Plate-Cell system* (engl. Flach-Platten-Zellen System) besteht aus zwei Elementen, wobei eine aus Polycarbonat gefertigte Hälfte als Anoden- und ein aus PIC gefertigtes Element als Kathodenkammer fungiert. Wie aus Abb. 6 A) ersichtlich, bilden beide Elemente eine funktionale Einheit, wobei eine Edelstahlvorrichtung die sichere und stabile Installation ermöglicht.

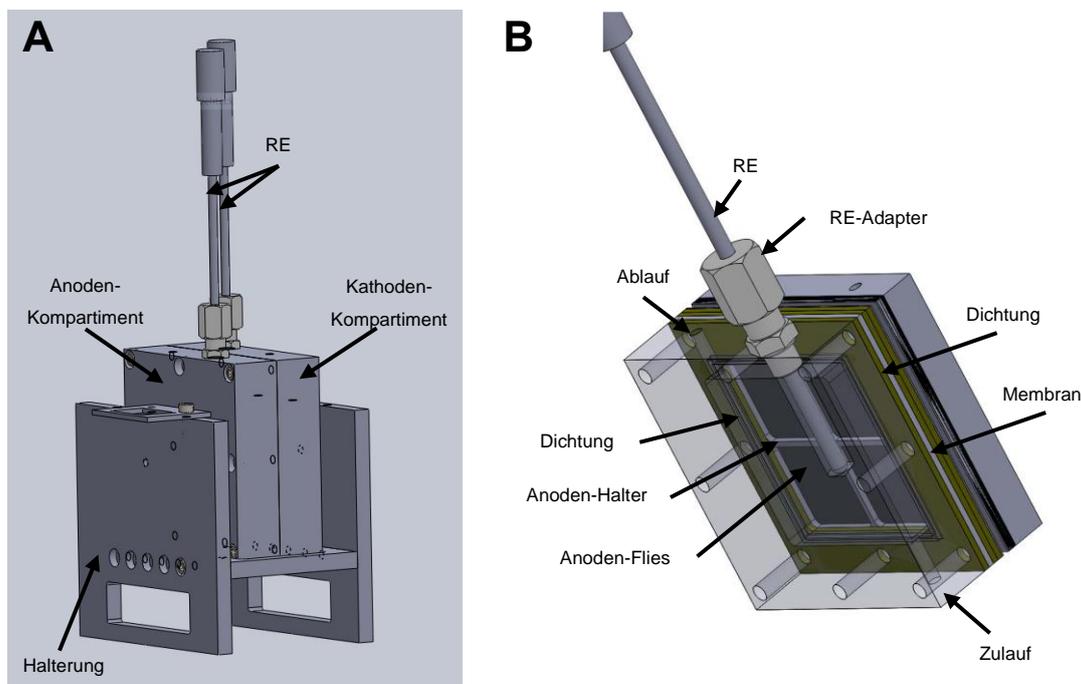


Abb. 6: Aufbau des FPC Systems, konstruiert und gebaut in der Gruppe von Prof. Sven Kerzenmacher (Fachgebiet Umweltverfahrenstechnik Universität Bremen). Schematischer Aufbau des Systems im A) betriebsbereiten Zustand, B) technischer Aufbau der Kompartimente am Beispiel des Anodenelements (RE- Referenzelektrode).

Im Weiteren ist der innere Aufbau beider Elemente identisch (am Beispiel der Anodenkammer in Abb. 6 B gezeigt). Die beiden funktionalen Kammern werden durch eine Flachdichtung abgedichtet und durch eine Protonenaustauscher-Membran (engl. *PEM*) voneinander getrennt (Abb. 6 B, gelb-grau markiert). Der Unterschied beider Hälften wird durch das Elektrodenmaterial festgelegt, dabei diente für die Anode ein 36 cm² Graphitvlies (SIGRACELL®Carbon, GFD 2,5 EA, SGL Group; Wiesbaden) und für die Kathode ein Edstahlgitter derselben Dimension.

Die Verbindung ist durch den Kontakt der Elektroden mit einem Titanium-Draht gewährleistet, wobei dessen Enden durch die Dichtungen nach außen geleitet werden und den Anschluss an den Potentiostat ermöglichen. Eine weitere Besonderheit bilden die vertikal in den Kompartimenten eingearbeiteten Zu- und Abläufe (sowohl für Anoden- als auch Kathodenelement), die eine permanente Zirkulation ermöglicht. Jedes Kompartiment besitzt sein eigenes Medienreservoir, das jeweils 250 ml umfasst. Die Rezirkulationsflussrate der Anode betrug 20 ml/min, während die der Kathode auf 10 ml/min eingestellt wurde. Das verwendete Substrat ist aus Abschnitt 2.6 zu entnehmen.

2.15.3 Bioelektrochemische Betriebsmodi

Die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente im bioelektrischen System erfolgten sowohl unter Batch- als auch Durchflussbetrieb. Während die in Abschnitt 3.1 und 3.2 vorgestellten Experimente im Batch-Modus mit synthetischem Medium durchgeführt wurden, erfolgten die Experimente aus Abschnitt 3.4 und 3.5 unter einem kontinuierlichen Austausch des Mediums mit Hydrolyseflüssigkeit. Um den Organismen die Anpassung an die Hydrolyseflüssigkeit zu ermöglichen, wurde eine hydraulische Verweilzeit (HRT) von 12,5 Tagen gewählt. Dafür wurde eine 4-Kanal-Peristaltikpumpe (IPC, Ismatec, Wertheim) und Schläuche mit einem Innendurchmesser von 0,51 mm (Tygon® LMT-55 2-Stopperschläuche, Erweiterungsschläuche, Cole-Parmer, Wertheim und Schlauchverbinder $I\varnothing = 0,58$ mm, $A\varnothing = 0,90$ mm, $L = 25$ mm, LHG, Karlsruhe) benutzt. Eine weitere Besonderheit im kontinuierlichen Modus stellte die Erweiterung der Systeme durch ein pH-Messmodul dar. Hierbei wurden ein pH-Transmitter (si628 P wall mount Transmitter, Hachlange, Düsseldorf) und eine pH-Sonde (pH-Elektrode 5330, gel, PTFE, Hachlange, Düsseldorf) verwendet, um den physiologischen pH-Bereich zu wahren. Der Transmitter wurde so programmiert, dass bei Erreichen eines unteren Schwellenwertes von pH 6,8 die Zugabe von 1 M KOH (anoxisch) startete und diese bei einem Wert von pH 7,1 wieder stoppte. Ein oberer Schwellwert wurde nicht gesetzt, da eine kontinuierliche Ansäuerung durch die N_2/CO_2 -Begasung vorlag.

2.16 Analytische Methoden

2.16.1 High Performance Liquid Chromatographie - HPLC

Diverse organische Substrate und Produkte wurden mittels der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) detektiert. Die analytische Methode der HPLC beruht auf einem chromatographischen Trennverfahren, wobei Stoffgemische durch Interaktion zwischen mobiler und stationärer Phase getrennt werden. Die anschließende Erfassung der Substanzen erfolgte durch geeignete Detektoren. In dieser Arbeit erfolgte die Auftrennung mittels eines UltiMate3000 System (Thermo Fisher Scientific) bestückt mit einer Aminex HPX-87H Säule (300x7,8 mm, Bio-Rad, München). Zur Probenvorbereitung wurden die Proben über einen Membranfilter (0,2 µM) filtriert und 150 µl mit 15 µl 0,5 M H₂SO₄ angesäuert. Bei einer Flussrate von 0,6 ml/min, 45 °C Säulentemperatur und 5 mM H₂SO₄ mobiler Trennphase erfolgte die chromatographische Auftrennung. Die Detektion der Substanzen erfolgte standardmäßig bei $\lambda = 275$ nm mit einem analytischen Dioden Array Detektor und einem RefractoMax 521 Brechungsindex Detektor (RI). Die anschließende Auswertung erfolgte mittels der Chromeleon 11 Software, wobei verschiedene Konzentration an Acetat, Propionat, Butyrat und Acetoin als Standard dienten.

2.16.2 Gaschromatographie - GC

Die Probenanalyse der in Abschnitt 3.6 vorgestellten Produktionsexperimente erfolgten durch eine gaschromatographische Analyse. Im Unterschied zur HPLC Analyse werden die Proben hier im System verdampft, wobei die unterschiedliche Bindungsaffinität der verdampften Substanzen zur mobilen und stationären Phase eine Auftrennung der Gase herbeiführt. In dieser Arbeit konnte mittels HPLC-Analyse Acetoin und Propionat nicht voneinander getrennt detektiert werden, weshalb auf die GC-Analyse zurückgegriffen wurde. Ähnlich der Probenvorbereitung zur HPLC-Analyse wurden die Proben mittels eines Membranfilters filtriert (0,2 µM) und anschließend mit 17 % Phosphorsäure angesäuert. In dieser Arbeit wurde das System Shimadzu GC-2000 Plus verwendet, ausgestattet mit einem *split/splitless* Injektorsystem (AOC 20s auto sampler, Shimadzu Germany, Duisburg). Die Detektion der Substanzen erfolgte über einen Det3ch FID (Shimadzu Germany). Helium diente als Trägergas mit einer Flussrate von 22,7 ml/min. Die Injektor-Temperatur wurde auf 150 °C im *splitmode* 1 min *splittime* gesetzt. Die chromatographische Auftrennung erfolgte mittels einer Stabilwax-DA Säule (30 x 0,25 mm ID, Kapillarsäule mit á 0,25 mm stationärer Filmdicke) von RESTEK (RESTEK GmbH, Bad Homburg).

Die Ofentemperatur, wurde wie gefolgt programmiert: initiale Temperatur 80 °C, steigend mit 30 °C/min zu 150 °C, gefolgt von 8 °C/min bis 240 °C. Die FID Parameter wurden auf 280 °C gesetzt unter der Verwendung eines H₂- und O₂-Flusses von 40 ml/min und 400 ml/min. Die Quantifikation der Substanzkonzentrationen erfolgte unter Verwendung der ChromSquare GC/GC Software v 3.1.

2.16.3 Micro Gaschromatographie - μ GC

In dieser Arbeit wurde die Gaszusammensetzung der in Abschnitt 3.6 aufgeführten Experimente mittels eines 490 Micro Gaschromatographen (Agilent Technologies Deutschland, Waldbronn) analysiert. Die Probenentnahme erfolgte nur, wenn der Druck im Gefäß auf Normaldruck eingestellt war. Die Messung erfolgte nach den folgenden Einstellungen: 5 s Stabilisierung nach Start; 20 s Probenentnahme; 110 °C Messgasleitung und Injektor Temperatur; 50 ms Injektor Zeit; erste Säule: 10 m MS5A, Trägergas Argon, Säulentemperatur 70 °C und 150 kPa Säulendruck und zweite Säule: 10 m PPQ, Helium als Trägergas bei 45 °C Säulentemperatur und 150 kPa Säulendruck. Die Auswertung erfolgte mittels der vom Gerätehersteller bereitgestellten Software MikroGC (online). Der Abgleich der erhaltenen Chromatogramme durch Referenzstandards (H₂: 0 %, 1 % und 80 %, O₂: 0 % und 21 %, N₂: 0 %, 78 %, 80 %, 97 % und 100 %, CH₄: 0 % und 1 %, CO₂: 0 %, 1 % und 20 %) ermöglichte die quantitative Auswertung.

2.16.4 Bestimmung des löslichen Kohlenstoffes

Die Ermittlung des gesamten organischen Kohlenstoffes einer Probe erfolgte mittels TOC Analysator TH600, Multi N/C 2100S der Firma Analytic Jena (Analytic Jena, Jena). Der TOC-Gehalt errechnet sich dabei aus einer Differenzmethodik, wobei der TOC (*total organic carbon*) aus der Differenz des Gesamtgehalts an Kohlenstoff und des anorganischen Kohlenstoffgehalts (*total inorganic carbon*) bestimmt wird. Die Bestimmung des TIC (*total inorganic carbon*) erfolgt durch die Ansäuerung der Probe mit 10 %-iger Phosphorsäure, wobei anorganische Kohlenstoff in Form von CO₂ durch die Ansäuerung ausgetrieben wird. Der resultierende CO₂-Gehalt wird dann mit einem nicht-dispersiven infrarot Sensor (NDIR) gemessen. Die Detektion des TC (*total carbon*) erfolgt hingegen thermisch. Dabei wird die Probe bei 800 °C unter Verwendung eines Platin-Katalysators mit Sauerstoff zu CO₂ verbrannt und anschließend mit dem NDIR-Detektor bestimmt. Die Proben wurden filtriert (0,2 μ M Membranfiltriert) gemessen und je nach TOC-Gehalt in verschiedene Verdünnung in 2 ml TOC-Gefäße gegeben. Die Auswertung erfolgte mit der Software multiWin^R (Analytic Jena) durch Abgleich mit einer zuvor erstellten Eichgerade.

2.16.5 Ionenchromatographie - IC

Die Ionen-chromatographische Untersuchung der in Abschnitt 3.3 vorgestellten Hydrolyseflüssigkeit wurde entweder am Engler-Bunte-Institut, Institut für Abwassertechnik, AG-Horn, KIT Campus Süd durch Frau Dr. Ali oder an einem Dionex ICS-1100 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) durchgeführt. Im Allgemeinen besteht das System aus einer mobilen Phase, einem Injektor, einer Vor- und Trennsäule (stationäre Phase), einem elektrolytischen Suppressor und einem Leitfähigkeitsdetektor. Nachdem die Probe in die mobile Phase injiziert wird, befördert das System den Analyten zur analytischen Trennsäule. Hier findet eine Wechselwirkung mit der stationären Phase statt (Ionenaustauschreaktion), wobei die unterschiedlich starken Wechselwirkungen und Affinitäten zu unterschiedlichen Retentionszeiten führen. Bevor die quantitative Bestimmung des Analyten im Leitfähigkeitsdetektor (*DS6 Heated Conductivity Cell*, Thermo Fisher Scientific) erfolgt, wird die Phase zur Herabsetzung der Grundleitfähigkeit zuvor einem Suppressor unterzogen. In Abhängigkeit der zu untersuchenden Substanzen erfolgte die Verwendung einer Anionenaustausch- (IonPac™ AS9-HC; Thermo Fisher Scientific) als auch Kationenaustauschsäule (IonPac™ SCS 1; Thermo Fisher Scientific) und deren zugehöriger Vorsäule (Dionex™ IonPac™ AG9-HC Guard Column und Dionex™ IonPac™ SCG 1 Guard Column). Für die Detektion von Anionen im 12 mV Betrieb diente 9 mM NaHCO₃ unter zusätzlicher Verwendung des Suppressor AERS 500 (2 mm, Thermo Fisher Scientific) als Eluent. Die Quantifizierung von Kationen erfolgte mit 3 mM CH₃SO₃H ohne Verwendung eines vorgeschalteten Suppressors. Unter beiden Bedingungen wurde die Durchflussrate von 0,25 ml/min, 30 °C und 30 min Laufdauer eingestellt. Entsprechend der Probenvorbereitung aus Abschnitt 2.16.1, wurden die Proben mittels eines Membranfilters filtriert (0,2 µM) und anschließenden mit _dH₂O verdünnt, sodass die Konzentration von 1,5 mM nicht überschritten wurde. Die Auswertung der Analyse erfolgte mit der Software Chromeleon 7 (Thermo Fisher Scientific) unter Einbezug der entsprechenden Kalibriermessreihe mit 8 Messpunkten (0,02 bis 1,5 mM).

2.17 Evaluationsparameter

2.17.1 Berechnung der Acetoin-Ausbeute

Die Berechnung der Kohlenstoff-zu-Acetoin-Ausbeute für die heterotrophen und mixotrophen Bedingungen erfolgte nach der in Abb. 27 und Abb. 28 dargestellten Vorgehensweise (Anhang).

2.17.2 Wachstumsrate

Die Wachstumsrate μ [h^{-1}] errechnet sich aus den, zu den Zeiten t_0 und t_1 gemessenen optischen Dichten (OD_{600}) x_0 und x_t . Die Berechnung erfolgte nach Formel 1.

$$(1) \quad \mu = \frac{\ln(x_t) - \ln(x_0)}{t - t_0}$$

2.17.3 Coulomb'sche Effizienz

Die Evaluierung der anodischen Oxidation erfolgte über die Berechnung der Coulomb Effizienz (CE) nach Rabaey & Verstraete, 2005. Im Allgemeinen wird das Verhältnis des gemessenen Stroms zur gemessenen Substratabnahme bestimmt, was Hinweise zur bioelektrochemischen Effizienz des jeweiligen Prozesses gibt. Die Berechnung erfolgte nach Formel 2.

$$(2) \quad CE = \frac{\int_0^t I}{\Delta c \cdot V_R \cdot e^- \cdot \epsilon \cdot N_A}$$

I Stromstärke

t Zeit

c Konzentration des Substrats

V_R Volumen im jeweiligen Reaktor

ϵ Elementarladung = $1,6 \cdot 10^{-19}$ C (Lide, 2010)

N_A Avogadro-Konstante [$N_A = 6,02 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$] (Lide, 2010)

2.17.4 Mittlere Stromdichte

Um einen Vergleich der in dieser Arbeit durchgeführten bioelektrochemischen Experimente zu erhalten, wurde die mittlere Stromdichte für den experimentellen Zeitraum nach Formel 3 berechnet.

$$(3) \quad j = \frac{\int_0^t I}{t \cdot A}$$

j Stromdichte

I Stromstärke

t Zeit

A Elektrodenfläche

3. Ergebnisse

3.1 Anodisches Konsortium

Im Rahmen des angestrebten Prozesses stellen Acetat und Butyrat die Zielmoleküle der bioelektrochemischen Elimination dar. In Bezug auf die Prozessstabilität und Leistungsfähigkeit entscheidet neben der metabolischen Passfähigkeit der gewählten exoelektrogenen Organismen ebenfalls deren Spezifität über die Praktikabilität des Gesamtprozesses. Einen potenziellen Kandidaten für den elektrochemischen Acetat-Abbau stellt das δ -Proteobakterium *Geobacter sulfurreducens* dar. Dieser hoch effiziente Modellorganismus ist einer der bestbeschriebenen exoelektrogenen Mikroorganismus, der darüber hinaus zur metabolischen Kooperation mit anderen Mikroorganismen befähigt ist. Sein organisches Substratspektrum ist auf Acetat beschränkt, wobei dessen effiziente Oxidation mit einer hohen Stromproduktion korreliert (Röling, 2014). Das breite Einsatzgebiet sowohl im Feld der Bioremediation als auch in der bioelektrochemischen Abwasserreinigung macht ihn zu dem geeignetsten Kandidaten für die anodische Acetatelimination. Die Elimination von Butyrat stellt eine größere Herausforderung dar - *Geobacter metallireducens* ist ein potenziell hoch effizienter Kandidat mit ähnlichen Vorteilen im Vergleich zu *G. sulfurreducens*, jedoch umfasst sein Substratspektrum auch Propionat, das für den angestrebten Prozess eher ungünstig erscheint. Um einen geeigneten Biokatalysator für diesen entscheidenden Prozessschritt zu ermitteln, sollte daher im Folgenden eine hoch spezialisierte exoelektrogene butyrat-oxidierende Gemeinschaft angereichert, mechanistisch verstanden und in Bezug auf den Gesamtprozess untersucht werden.

3.1.1 Initiale Anreicherung eines exoelektrogenen Konsortiums

Im Rahmen dieses Vorhabens sollte ein geeignetes Konsortium exoelektrogener butyrat-oxidierender Mikroorganismen aus Umweltproben isoliert und angereichert werden. Als Anforderung der Probenstandorte wurde sowohl auf eine hohe mikrobiologische Diversität als auch auf ein Vorkommen an Butyrat geachtet. Unter diesen Grundvoraussetzungen erfolgte die Probenentnahme i) aus einer Dunggrube (30 - 40 cm Tiefe); ii) aus einem laufenden Dunkelfermentations-Prozess (Ali *et al.*, 2020) als auch von iii) einem anoxischem Sediment (20 - 40 cm Tiefe). Als Vorlage für das Anreicherungsmedium diente ein abgeändertes *G. sulfurreducens* Anodenmedium, mit Butyrat als einzige Kohlenstoffquelle (Tab. 8). Bei einem Potential von 0 mV vs. SHE, konstanter N₂/CO₂-Begasung und 30 °C erfolgte die Anreicherung in den Systemen nach Golitsch (2016).

Zur Reduktion des organischen Eintrags wurde die initiale Inokulation mit 1 % (v/v) des Probenmaterials durchgeführt. In Abb. 7 ist der zeitliche Stromdichtenverlauf, die Butyrat-Abnahme der mit A) Dung, B) Hydrolyseflüssigkeit und C) Sediment beprobten Zellen dargestellt.

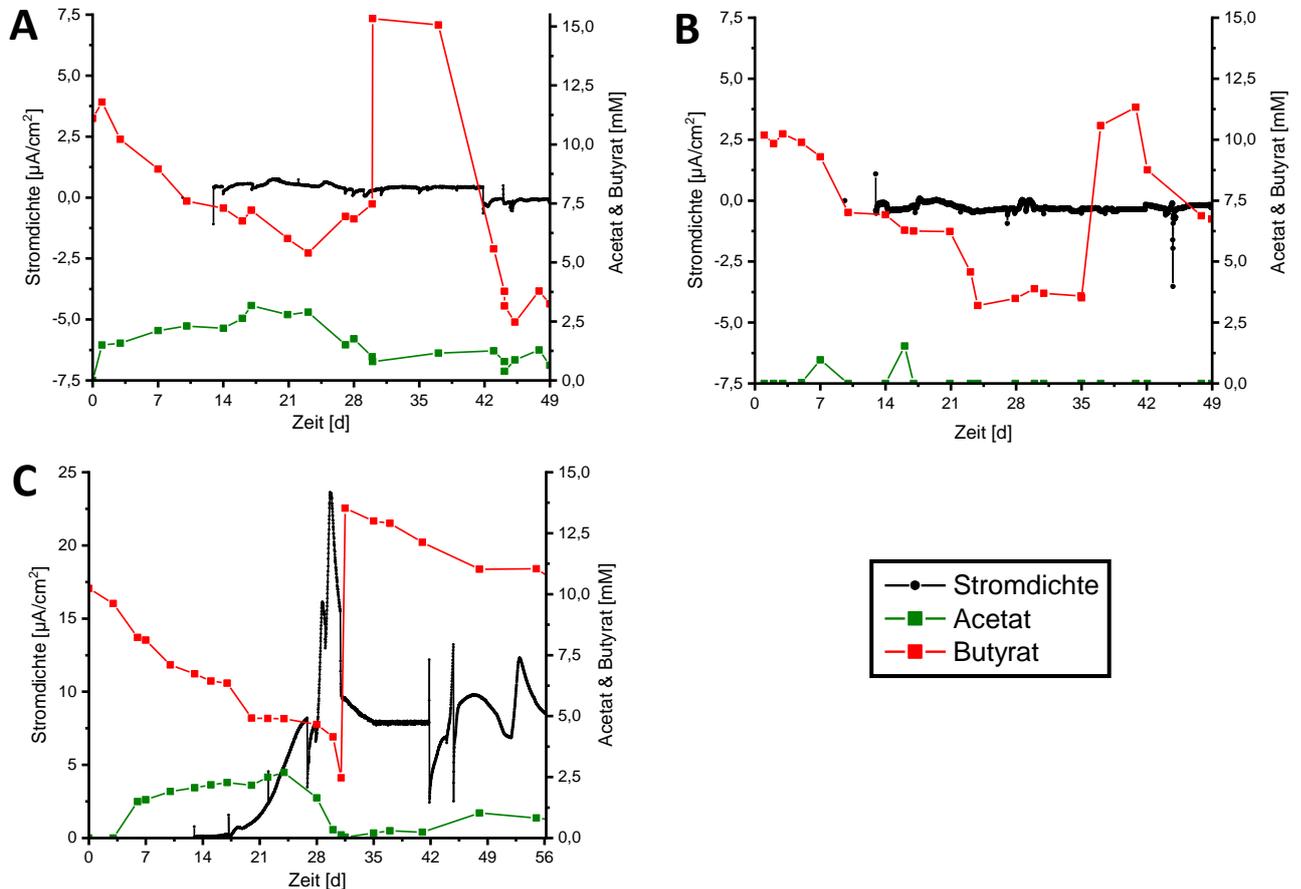


Abb. 7: Initiale Anreicherung butyrat-oxidierender exoelektrogener Mikroorganismen. Die Anreicherung erfolgte unter Verwendung von Butyrat-Medium, bei einem Potential von 0 mV vs. SHE, 30 °C und konstanter N_2/CO_2 -Begasung in den Systemen nach Golitsch (2016). Als Probenmaterial diente A) Dung, B) Hydrolyseflüssigkeit und C) anoxische Sediment-Proben. Gezeigt sind die jeweiligen Stromdichtenverläufe (linke y-Achse) und Konzentrationen von Acetat und Butyrat (rechte y-Achse). Auftretende Prozessschwankungen sind durch Unterschiede in der Begasung oder Entnahme der Elektrode zu erklären.

Wie aus den Verläufen ersichtlich, ist für alle Ansätze ein deutlicher Butyrat-Abbau innerhalb der ersten 30 Tage sichtbar. Dieser kann für die mit Kuhdung und Hydrolyseflüssigkeit inokulierten Zellen nicht mit einer zunehmenden Stromdichte korreliert werden. Eine erneute Substratzugabe (Abb. 7 A, Tag 30 und Abb. 7 B, Tag 35) resultierte in derselben Beobachtung und wurde aufgrund der schwankenden Akkumulation von Acetat auf nicht-exoelektrogene Seitenreaktionen zurückgeführt. Im Gegensatz dazu wurde für die mit Sediment beprobte Zelle ein starker Anstieg der Stromdichte ab Tag 14 beobachtet (Abb. 7 C, Maximum - 23 $\mu A/cm^2$ an Tag 30). Um einer potenziellen Substratlimitierung und der daraus resultierenden Prozessunterbrechung entgegenzuwirken, erfolgte die erneute Substratzugabe an Tag 32.

Als Resultat brach der Prozess kurzzeitig ein und stabilisierte sich bei ca. $8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ bis zum Zeitpunkt der Elektrodenentnahme (Tag 42). Nachfolgend zeichnete sich ein instabiler Prozessverlauf mit Schwankungen zwischen 10 bis $4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ab. Die starke Zunahme der Stromdichte in der mit Sediment inokulierten Zelle wurde als Hinweis auf die Anwesenheit exoelektrogener Mikroorganismen gedeutet. Für diese Zelle wurde eine Coulomb'sche Effizienz (CE) von 3,4 % zwischen Tag 14 und 30 und 3,6 % zwischen Tag 30 und 56 errechnet. Im Folgenden sollte das Konsortium der Sedimentzelle weiter angereichert und exoelektrogene Akteure selektiert werden.

3.1.2 Anreicherungsstrategie

Durch die zuvor beschriebene Anreicherung eines Anoden-reduzierenden und butyrat-oxidierenden Konsortium sollte nachfolgend die räumliche Verteilung der exoelektrogenen Hauptakteure identifiziert werden. Darüber hinaus sollte eine geeignete Transfermethode für die weitere Anreicherung etabliert werden. Dem in Abb. 8 aufgezeigten Schema folgend diente die Spenderzelle als Grundlage der nachfolgenden Untersuchungen.

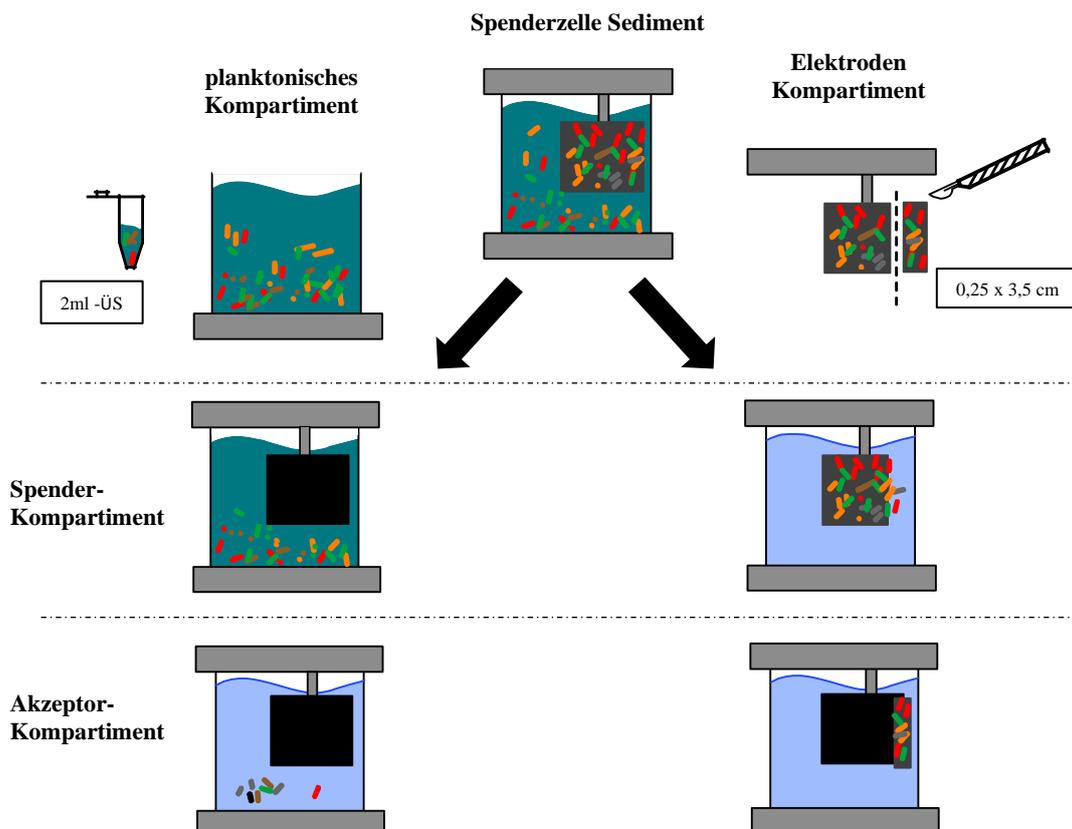


Abb. 8: Transfermethoden der Anreicherung exoelektrogener Mikroorganismen. Die Spenderzelle (Sedimentzelle) wurde unter anoxischen Bedingungen geöffnet und in zwei Kompartimente unterteilt (Elektrode, planktonische Phase). Das planktonische Spender-Kompartiment wurde mit einer neuen Elektrode (schwarz) bestückt und 2 ml des planktonischen Überstandes in eine frische (Akzeptor) Zelle überführt (linke Seite). Parallel dazu wurde die Spender-Elektrode in frisches Medium überführt und ein abgetrenntes Teil derselben auf einer neuen Anode fixiert (rechte Seite).

Hierfür wurde ein ca. 0,25 x 3,5 cm großes Elektroden-Stück aus dem Spender-Elektroden-Kompartiment präpariert und auf ein neues Elektroden-Kompartiment aufgesteckt. Beide Ansätze wurden anschließend in frisches Medium überführt und nach den Bedingungen aus Abschnitt 2.15.1 kultiviert (Abb. 8, rechte Spalte). Zur Untersuchung der planktonischen Phase wurden mit 2 ml des pelletierten Überstands ein neues System inokuliert (frisches Medium, neue Elektrode), wohingegen die planktonische Spender-Phase mit einer neuen Elektrode bestückt wurde (Abb. 8, linke Spalte). In Abb. 9 sind die jeweiligen Stromdichtenverläufe und quantifizierten Butyrat- bzw. Acetat-Konzentrationen über den zeitlichen Verlauf dargestellt.

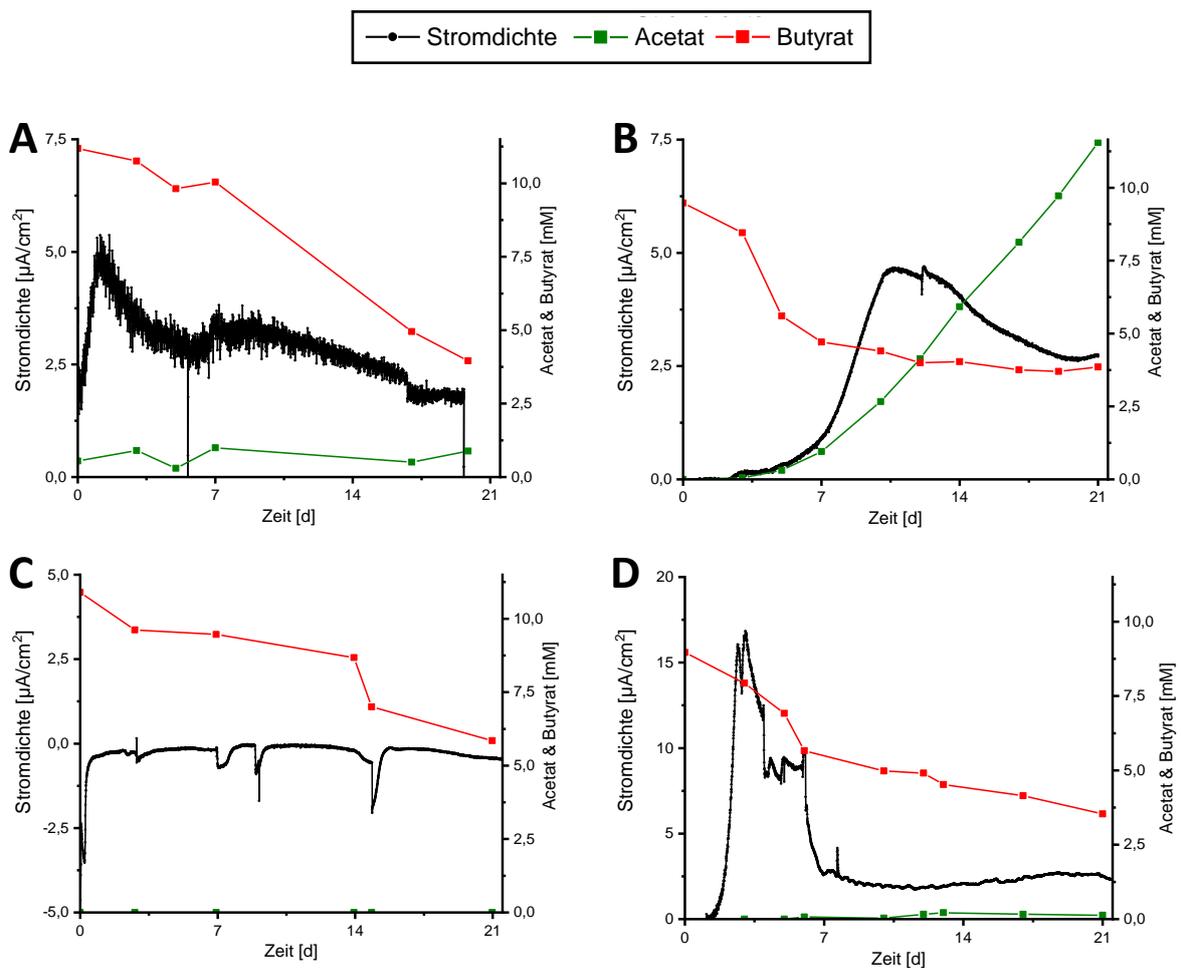


Abb. 9: Lokalisierung der angereicherten butyrat-oxidierenden Mikroorganismen. Ausgehend vom zuvor erläuterten Verfahrensschemata erfolgte die Untersuchung der A) planktonischen Spender-Phase, B) Spender-Elektrode, C) 2 ml der planktonischen Phase mit frischer Elektrode und frischem Medium und D) Spender-Elektrode auf neuer Akzeptor-Elektrode. Die Untersuchung erfolgte unter Verwendung von Butyrat-Medium, bei einem Potential von 0 mV vs. SHE, 30 °C und konstanter N₂/CO₂-Begasung in den Systemen nach Golitsch (2016). Gezeigt sind die jeweiligen Stromdichtenverläufe und Konzentrationen von Acetat und Butyrat. Die auftretende Prozessschwankungen sind auf Unterschiede der Begasung oder der Elektrodenentnahme zurückzuführen.

Beginnend mit den Spender-Kompartimenten, zeigte sich sowohl für die planktonische Phase als auch für die Elektrode ein Anstieg der Stromdichte innerhalb der ersten 7 Tage.

Während die planktonische Phase (Abb. 9 A) nach einem kontinuierlichen, zweitägigen Anstieg das Maximum von ca. $5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ erreichte, zeigte die Elektrode (Abb. 9 B) eine Verzögerung von drei Tagen und erreichte an Tag 9 das Maximum von ca. $5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. In beiden Systemen fiel die Stromdichte nach Überschreitung des Maximums auf $2,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ab. Auffällig erscheint die gebildete Acetatmenge, die im Elektrodenkompartiment konstant bis zu einem Wert von $12,5 \text{ mM}$ anstieg. Einen weiteren Unterschied bildete die auf die Butyrat-Oxidation errechnete Coulomb'sche Effizienz (CE), die für die Elektrode $10,1 \%$ und planktonische Phase $6,7 \%$ betrug. Mit Hinblick auf die Transfer-Ansätze sind deutlichere Unterschiede zu erkennen. Die mit planktonischem Überstand beimpfte Zelle zeigte über den gesamten Prozessverlauf keinen Stromertrag (Abb. 9 C). Auffällig erscheint die stetige Butyrat-Abnahme, die nicht mit einer Acetat-Akkumulation korreliert werden konnte. Im Gegensatz dazu wurde für die Akzeptor-Spender-Elektrode (Abb. 9 D) nach einer zweitägigen Verzögerungsphase ein rascher Anstieg der Stromdichte beobachtet, der an Tag drei ein Maximum von $17,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ erreichte. Der weitere Prozessverlauf ist durch einen unregelmäßigen Abfall der Stromdichte auf $3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ gekennzeichnet. Nachfolgend stabilisierte sich das System zwischen $2 - 3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Im Vergleich zur überführten Spender-Elektrode wurde nur eine geringfügige Acetat-Akkumulation detektiert. Die errechnete CE liegt bei der Spender- bzw. Akzeptor-Zelle bei $3,5 \%$ bzw. $10,5 \%$. Auf Grundlage dieser Beobachtungen konnte die Elektrode als funktionales Kompartiment des anodischen Buttersäure-Abbaus identifiziert werden. Auch wenn das planktonische Spender-Kompartiment einen zu dem Butyrat-Abbau korrelierenden Stromdichtenverlauf zeigte, wurde dies aufgrund der geringen CE von nachfolgenden Untersuchungen ausgeschlossen. Die vielversprechende Methodik des Elektrodentransfers sollte von nun an für die weitere Anreicherung des Konsortiums angewandt werden. Ausgehend von dem Akzeptor-Elektroden-Kompartiment, fortlaufend als 1. Transfergeneration bezeichnet (Abb. 9 D), erfolgte die weitere Anreicherung durch den Transfer der Elektrode.

3.1.3 Transferbasierte Anreicherung

In vorangegangenen Abschnitt konnte die Elektrode als funktionaler Teil des Anoden-gestützten Butyrat-Abbaus identifiziert werden. Im Weiteren sollte eine Anreicherung erfolgen, um eine hinreichende Stabilisierung und Steigerung des exoelektrogenen Prozesses zu erzielen, bei der die nicht-exoelektrogenen Seitenreaktionen verdrängt werden. Nach der Methodik aus Abb. 8 wurde aus jeder Generation ein Elektrodenstück isoliert und insgesamt über sieben Generationen transferiert. In Abb. 10 sind die aufgezeichneten Prozess- und Substratverläufe dargestellt.

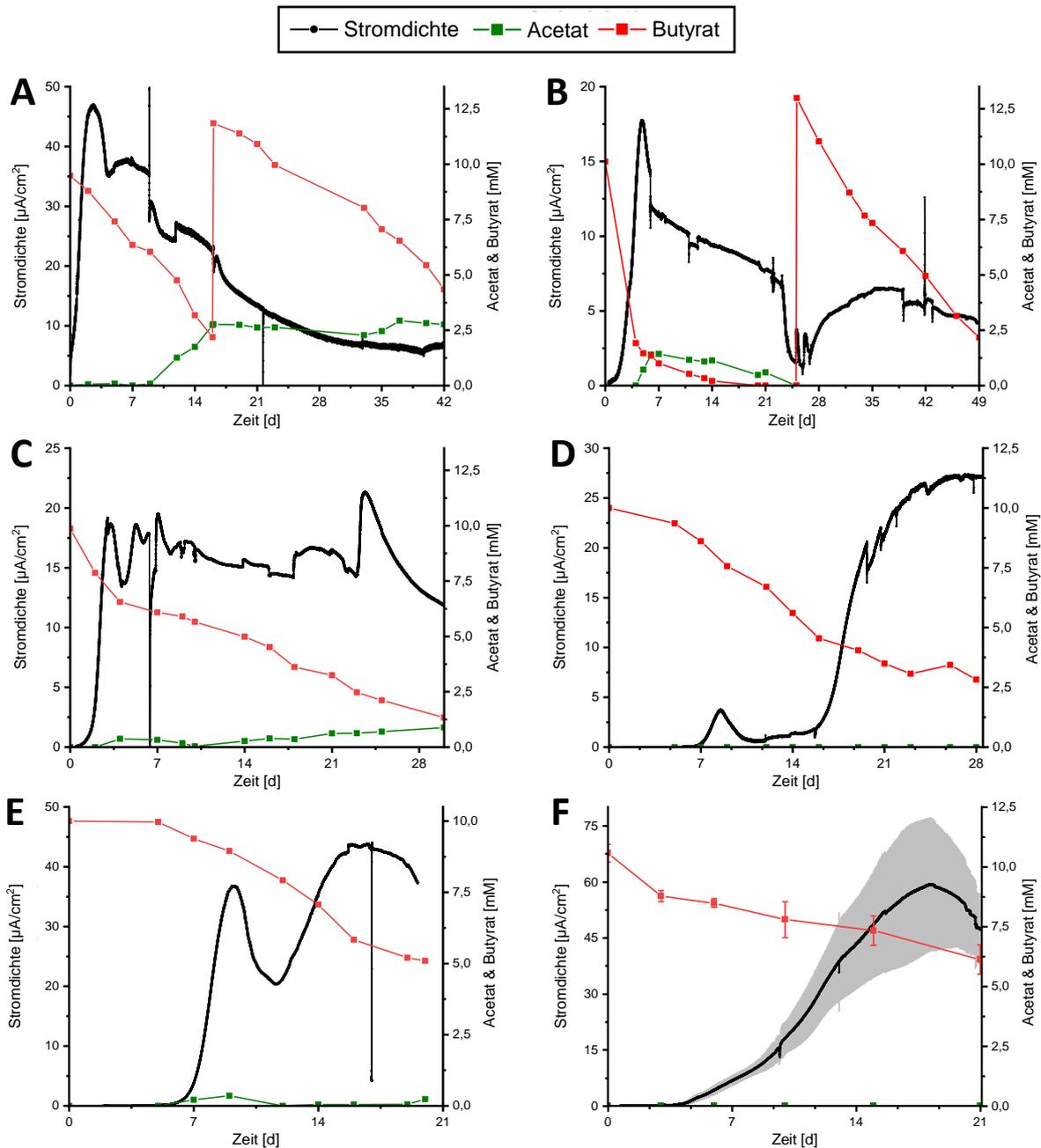


Abb. 10: Transferbasierte Anreicherung exoelektrogener butyrat-oxidierender Organismen. Die Isolation der Elektrode erfolgte nach dem Schema aus Abb. 8, ausgehend von der 1. Transfergeneration (Abb. 9 C). Gezeigt sind die Stromdichtenverläufe (linke y-Achse) und Acetat-/Butyrat-Konzentrationen (rechte y-Achse,) der A) 2., B) 3., C) 4., D) 5., E) 6 und F) 7. Generation. Die 2. bis 6. Generation wurden im Unikat, die 7. Generation im biologischen Triplikate durchgeführt. Die Untersuchungen erfolgten unter Verwendung von Butyrat-Medium, bei einem Potential von 0 mV vs. SHE, 30 °C und konstanter N₂/CO₂-Begasung in den Systemen nach Golitsch (2016).

In Bezug auf die aufgezeichneten Stromdichtenverläufe ist mit jedem Generationswechsel eine zunehmende Stabilisierung und Steigerung zu beobachten. In der zuvor vorgestellten ersten Generation wurde ein Stromdichtenmaximum von 17 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ nach 3,5 Tagen beobachtet, welches nachfolgend einen instabilen und stetigen Prozesseinbruch aufwies. Die zweite Generation erreichte eine 3,5-fache Steigerung mit 48 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$, ebenfalls gefolgt von einem Prozesseinbruch, welcher nicht durch eine Substratlimitierung herbeigeführt wurde.

Die 3. Generation erreichte nur ein Stromdichtenmaximum von $17,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, wobei der nachfolgende Einbruch durch eine erneute Substratzugabe stabilisiert werden konnte. Die darauffolgende 4. Generation bildete die erste Generation, in welcher nach Erreichung von $19,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ kein Prozesseinbruch den weiteren Verlauf bestimmte. Trotz etwaiger Schwankungen von $\pm 5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ hielt sich der Prozess bis zur vollständigen Substratverwertung bei $17 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Die Stabilisierung des Prozesses führte sich in der 5. und 6. Generation fort, wobei das Maximum von 27 auf $45 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ anstieg. Da ab der 4. Generation der Transfer nicht mehr aus laufenden Kulturen erfolgte, sondern die Elektroden bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt wurden, spiegelt die beobachtete Verzögerungsphase mit hoher Wahrscheinlichkeit eine verlängerte lag-Phase wieder. Ähnliches gilt für die 7. Generation, wobei die aus Generation 6 gedrittelte und homogenisierte Elektrode als Donor-Kompartiment diente. Im Gegensatz zu den vorherigen Generationen zeigte sich in der 7. Generation eine stetige Zunahme des Stromdichtenverlaufs mit einem Maximum von $60 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ nach ca. 17 Tagen.

Eine weitere Auffälligkeit bildete die mit steigender Generation ausbleibende Acetat-Akkumulation. Während sich in der 2. Generation nach 16 Tagen eine stabile Konzentration von $2,5 \text{ mM}$ im System hielt, wurden in den nachfolgenden Generationen Konzentrationen bis zu $1,1 \text{ mM}$ beobachtet. Im Unterschied zur 2. Generation sank die Acetat-Menge mit zunehmender Abnahme von Butyrat. In der 4. Generation traten vernachlässigbare Mengen ($< 0,8 \text{ mM}$) auf, welche über den Verlauf partiell zu- oder abnahmen. Ab der 5. Generation konnte kein Acetat mehr detektiert werden. Da neben der klassischen β -Oxidation auch syntrophe Abbaumechanismen von Butyrat bekannt sind (unter Freisetzung von Acetat und Wasserstoff), konnte zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht festgestellt werden, ob ein einzelner Organismus an der Butyrat-Oxidation und dem anodischen Elektrontransfer beteiligt ist oder gebildete Sekundärintermediate der anodischen Oxidation dienen.

Zusammenfassend konnte durch die angewandte Methodik eine effiziente Anreicherung eines Anoden-getriebenen, butyrat-abbauenden Konsortiums erreicht werden, wobei dies weiter durch die errechnete korrelierende CE gestützt wird. Wie aus Abb. 11 ersichtlich, stieg die CE mit fortlaufender Generation von $3,5 \%$ (1. Generation) bis 84% (7. Generation) an.

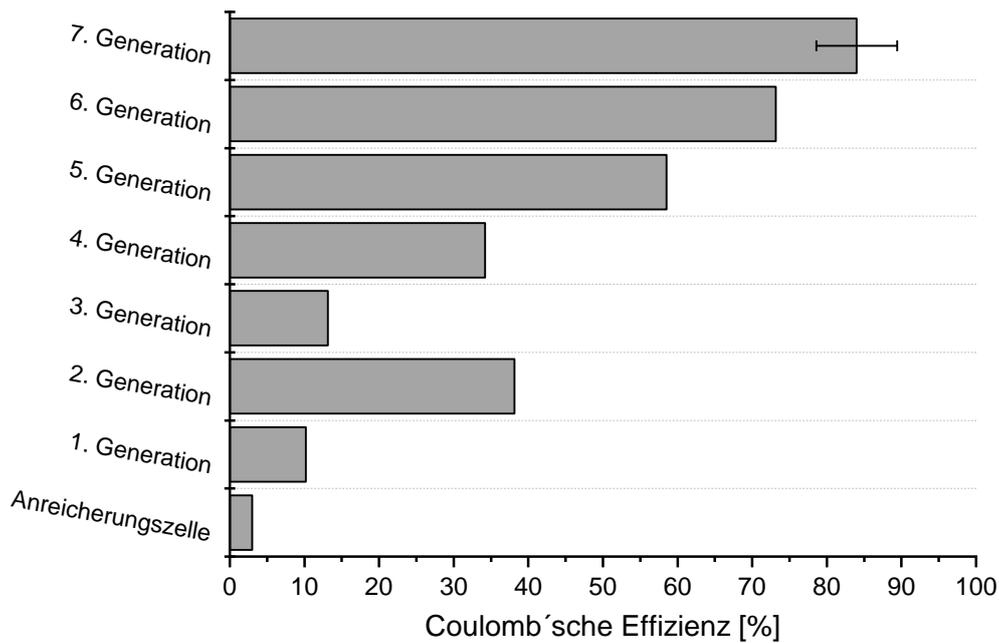


Abb. 11: Coulomb'sche Effizienz (CE) in % der Transfergenerationen aus Abb. 10. Die 2. bis 6. Generation wurden im Unikat durchgeführt, die 7. Generation im Triplikate.

3.1.4 16S-Diversitäts-Analyse

Zur Untersuchung der mikrobiellen Zusammensetzung des angereicherten Konsortiums wurde eine Diversitätsanalyse (16S-rDNA-Amplikon-Sequenzierung) durchgeführt. Als Probenmaterial diente sowohl planktonisches als auch sessiles Kompartiment. Die Isolation der genomischen DNA wurde nach der in Abschnitt 2.10.1 aufgeführten Methode durchgeführt. Die Amplifikation und Illumina-Sequenzierung erfolgten nach der in Abschnitt 2.13.2 beschriebenen Vorgehensweisen. Da bei der Verwendung von Archaea-spezifischen 16S-Primerpaaren kein PCR-Amplifikat erhalten werden konnte, scheinen Mitglieder der Archaea im angereicherten Konsortium nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Daher fokussierte sich die Diversitätsanalyse auf Bakterien. In Abb. 12 ist die bakterielle Diversität über den Generationenverlauf auf Klassen-Ebene sowohl für die Elektroden als auch für die planktonischen Phasen dargestellt. Die Analyse zeigt, dass unabhängig der Phase zu Beginn des Prozesses zehn phylogenetische Klassen vorliegen, welche sich über den Transferverlauf auf fünf reduzieren. Auffällig erscheint auch, dass die drei prozessdominierenden β -, γ - und δ -Proteobacteria, charakteristische Klassen von exoelektrogenen-Vertretern darstellen. Weiter deutet deren unterschiedliche Verteilung und generationenbedingte Dominanz in den Phasen auf phasenübergreifende Wechselwirkungen im Prozess hin.

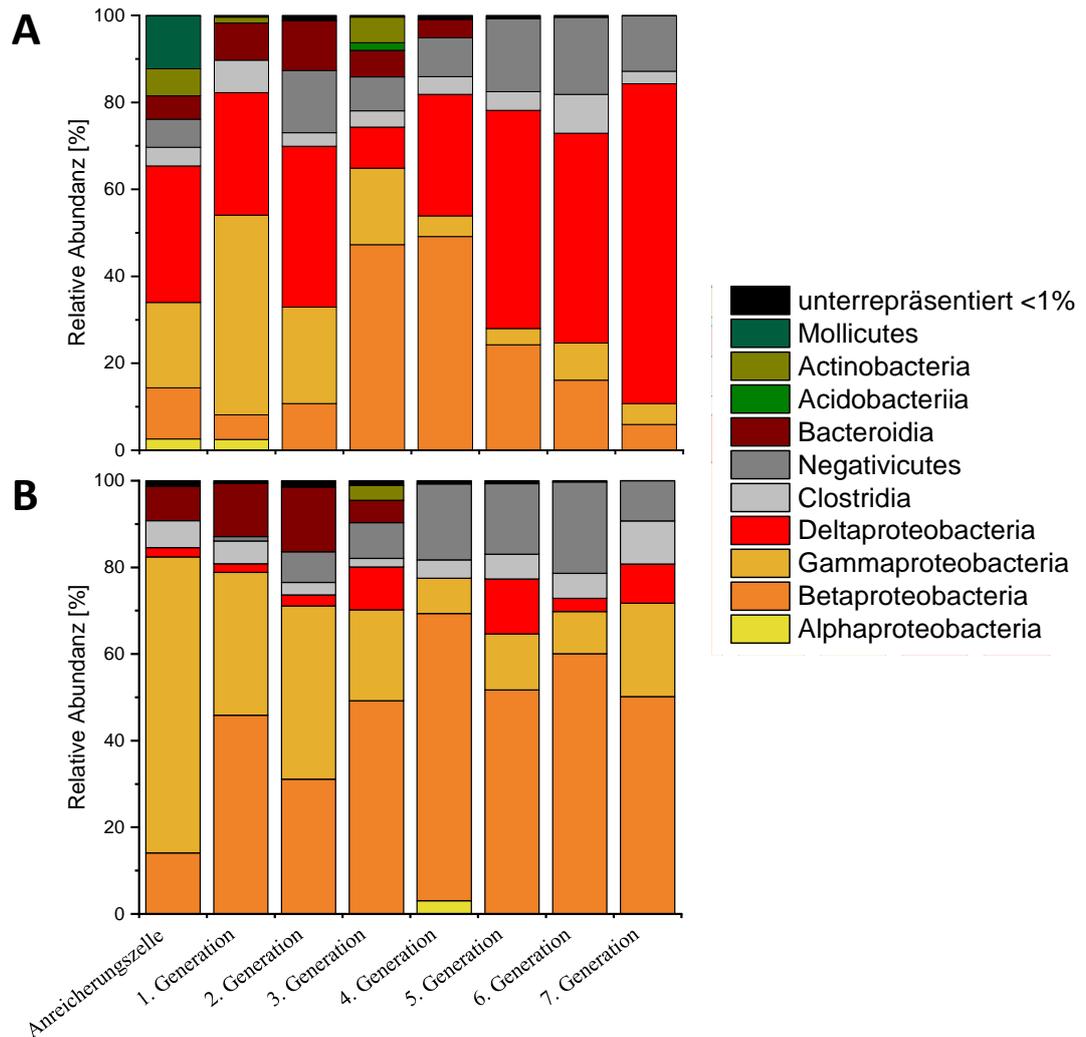


Abb. 12: 16S-rDNA-Amplikon-Sequenzierung des angereicherten butyrat-oxidierendem Konsortiums. Dargestellt sind die relativen Häufigkeiten der Anreicherungsgenerationen für Bacteria auf Klassen-Ebene für die A) Elektrode und B) planktonische Phase.

Für die Elektrode ist zu beobachten, dass mit fortschreitender Anreicherung zunehmend die δ -Proteobacteria dominieren (Abb. 12 A). Mit einer relativen Häufigkeit von 31,3 % in der Anreicherungsphase ist eine stetige Zunahme über die Folgegenerationen ersichtlich. In der 7. Generation bilden diese die dominanteste Klasse mit bis zu 73,5 % der relativen Häufigkeit. Eine Ausnahme bildet die 3. Generation, wobei diese nur eine relative Häufigkeit von 9,4 % aufweisen. Hierbei dominieren überwiegend die β - und γ -Proteobacteria mit je 47,3 % und 17,6 %, gefolgt von den Negativicutes mit 7,9 %. Eine in der 4. Generation anhaltende Dominanz der β -Proteobacteria schlägt in eine zunehmende Verdrängung um, wobei diese in der 7. Generation nur noch mit einer relativen Abundanz von 5,9 % vertreten sind. Ähnliches ist auch für die γ -Proteobacteria zu beobachten. Die zu Beginn vertretene Klasse der Clostridia weist eine über den Prozess verteilte stabile Häufigkeit von 2,9 % mit individuellen Schwankungen auf.

Die bis zur 5. Generation schwankende Häufigkeit der Negativicutes stabilisierte sich nachfolgend auf ca. 1,7 % +/- 0,5 %. Die noch bis in die 3. Generation vertretenen Klassen der Mollicutes, Actinobacteria, Acidobacteria und Bacteroidia sind bis zur 6. Generationen vollständig verdrängt. Im weiteren Blick auf die planktonische Phase bilden die β - und γ -Proteobacteria die dominantesten Klassen in allen Generationen (Abb. 12 B). Jedoch werden die in der Anreicherungszone noch dominierenden γ -Proteobacteria (68,3 %) über den Transferverlauf zunehmend durch die β -Proteobacteria verdrängt (1. Gen. - 14 % vs. 7. Gen. - 50,2 %). Vergleichend zur Elektrode wurde eine Anreicherung der Bacteroidia bis zur 2. Generation beobachtet, die nachfolgend vollständig verdrängt wurden. Die relative Häufigkeit der Negativicutes und Clostridia ist ebenfalls vergleichbar zur Elektrode. Mit einer stabilen Häufigkeit von jeweils 5,7 % und 21,1 % bis zur 6. Generation, zeigt sich in der 7. Generation eine ausgeglichene relative Häufigkeit von je 9,9 % und 9,3 %. Im Unterschied zur Elektrode variiert die Häufigkeit der δ -Proteobacteria und eine Anreicherung liegt nicht vor. Ein weiterer Unterschied zur Elektrode bildet das Ausbleiben der Mollicutes und Acidobacteria. Das Aufkommen der Actinobacteria ist nur einmalig in Generation 3 zu beobachten (3,4 %). Zusammenfassend konnte die Anreicherung potenziell exoelektrogener Klassen auf Grundlage der 16S-Amplikon-Sequenzierung beobachtet werden. In Übereinstimmung mit den Erkenntnissen aus Abschnitt 3.1.3, korreliert die steigende relative Häufigkeit der δ -Proteobacteria auf der Elektrode mit dem positiven Trend des elektroden-assistierten Butyrat-Oxidation Prozesses.

3.1.5 Metagenom- und Metatranskriptom-Analyse des Biofilms

Die Ergebnisse der vorangegangenen 16S-Amplikon-Sequenzierung deuteten auf eine mit fortschreitender Generation steigende Anreicherung potenziell exoelektrogener Mikroorganismen auf der Elektrode hin. Die nähere Betrachtung der taxonomischen Verteilung deutet dabei auf eine Korrelation zwischen der Prozesssteigerung und der relativen Häufigkeit der δ -Proteobacteria hin. Das Aufkommen weiterer Klassen konnte auf Grundlage der 16S-Analyse nicht näher mit einem ein- oder mehrstufigen Butyrat-Abbau in Zusammenhang gebracht werden. Zur Aufklärung der am Prozess maßgeblich beteiligten Schlüsselorganismen und zur Aufschlüsselung der funktionellen physiologischen Wechselwirkungen wurde im weiteren Teil der Arbeit eine Metagenom- und Transkriptom-Analyse durchgeführt. Ausgehend von dem Elektrodenmaterial der 7. Generation erfolgte sowohl die Isolation der genomischen DNA und gesamt RNA als auch die Illumina-Sequenzierung nach der in Abschnitt 2.10. und 2.13.2 aufgeführten Vorgehensweise. Die Prozessierung der Rohdaten wurde mittels der SqueezeMeta Pipeline bewerkstelligt (vgl. Abschnitt 2.14.2).

In Tab. 15 sind die Kennzahlen der Rohdaten der Illumina-Sequenzierung des Metagenoms und -transkriptoms dargestellt.

Tab. 15: Assembly-Statistiken des analysierten Metagenoms und -transkriptoms.

	Metagenom (DNA)	Metatranskriptom (RNA)
Anzahl der Basen [bp]	5.362.746.578	3.075.006.664
Anzahl der <i>reads</i>	35.514.878	40.460.614
Anzahl der <i>contigs</i>	17.180	n/v
Längster <i>contig</i> [bp]	539.684	n/v
kürzester <i>contig</i> [bp]	206	n/v
N50 [bp]	34.068	n/v

3.1.5.1 Metagenom-Analyse

Die taxonomische Klassifizierung der prozessierten Metagenom-Daten erfolgte durch Abgleich der codierenden Bereiche mit der Diamond Datenbank. Hierbei wurden 94,75 % der prozessierten *reads* den Domänen der Bacteria, Archaea und Eukaryota zugeordnet, wobei ein Großteil der taxonomischen Ränge durch die Bacteria vertreten sind (Tab. 16). Die *read*-Anzahl der Archaea und Eukaryota stellten eine deutliche Minderheit dar (je $< 6,9 \cdot 10^{-5}$ % der Verteilung) und wurden in den nachfolgenden Analysen vernachlässigt.

Tab. 16: Taxonomisch Statistik der Metagenom Analyse. Dargestellt ist die taxonomische Verteilung der *reads*.

taxonomische Zuordnung	Bacteria	Archaea	Eukaryota
Reich	33.652.146	8	134
Phylum	(8) 33.628.241	n/V	n/V
Klasse	(15) 33.436.280	n/V	n/V
Ordnung	(27) 33.078.492	n/V	n/V
Familien	(39) 32.811.270	n/V	n/V
Gattung	(61) 28.937.759	n/V	n/V

Im ersten Schritt erfolgte die taxonomische Untersuchung der Bacteria auf Klassen-Ebene (Abb. 13 A). Im Vergleich zu den Ergebnissen der 16S-Amplikon-Analyse wurden auch hier die Klassen der β -, γ -, δ -Proteobacteria, Clostridia und Negativicutes mit > 1 % der relativen Häufigkeit ermittelt. Die δ -Proteobacteria bilden erneut die dominanteste Klasse und sind mit 90,12 % der relativen Häufigkeit deutlich stärker vertreten als zur vorangegangenen 16S-rDNA-Amplikon-Analyse (Abb. 12 A, 7. Generation). Im weiteren Unterschied bilden die β -Proteobacteria mit 5,12 % der relativen Abundanz die zweit häufigste Klasse, gefolgt von den Negativicutes (2,31 %), Clostridia (1,42 %) und γ -Proteobacteria (1,02 %).

Auffällig erscheint, dass im Vergleich zur 16S-Amplikon-Analyse, die Klassen einen deutlich geringeren Gesamtanteil in der Gemeinschaft einnehmen.

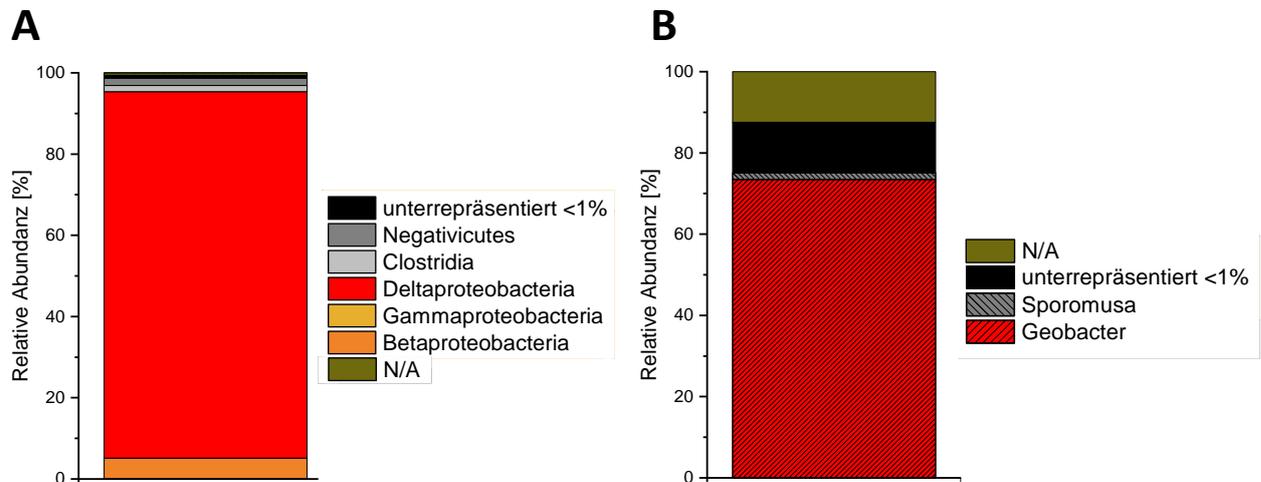


Abb. 13: Taxonomische Klassifikation der Metagenom-Sequenzierung der 7. Elektrodengeneration. Dargestellt ist die A) Klassen- und B) Ordnungs-Ebene.

Zur weiteren Aufschlüsselung der Gemeinschaft und zum Erlangen erster Einblicke in die metabolischen Vorgänge, wurde die taxonomische Untersuchung auf Gattungsebene fortgeführt. Insgesamt wurden 61 Gattungen identifiziert, welche 85 % der Metagenom-*reads* zugeordnet werden konnten (Tab. 15). Durch die Zusammenfassung von taxonomischen Gruppen mit einer relativen Häufigkeit < 1 %, bildeten *Geobacter* und *Sporomusa* die einzig detektierten Gattungen (Abb. 13 B). Erstere bildet mit einer relativen Abundanz von 73,5 % die dominanteste Gruppe. Als Vertreter der δ -Proteobacteria sind diese als dissimilatorische Eisenreduzierer bekannt und bilden die charakteristischste Gattung der exoelektrogenen Mikroorganismen. Bezüglich ihrer Physiologie sind alle bekannten Arten zur Acetat-Oxidation und der Reduktion von dreiwertigem Eisen (Fe[III]) befähigt. Je nach Stamm ist die Nutzung weiterer Elektronenakzeptoren möglich, wobei ein breites Spektrum an organischen als auch anorganischen Elektronenakzeptoren genutzt werden kann (Mahadevan *et al.*, 2006). Die Klasse der Negativicutes ist mit einer relativen Häufigkeit von 2,3 % durch *Sporomusa* vertreten und bildet dabei den zweiten alleinigen Gattungsvertreter. Als chemolithotrophe Mikroorganismen beschrieben, sind Vertreter zur Acetat-Assimilation mittels des reduktiven Acetyl-CoA-Wegs (Wood-Ljungdahl) befähigt. Ihre Affinität zu Wasserstoff bildet die Grundlage vieler MES Anwendungen (Breznak, 2006). Weitere Beobachtung und der Vergleich auf Klassenebene zeigt das Ausbleiben von Gattungen der β -, γ -Proteobacteria und Clostridia. Auf Grundlage nicht annotierter *reads* und unterrepräsentierten Gattungen ist entweder eine nähere taxonomische Klassifizierung nicht möglich oder die Gruppen weisen eine hohe Diversität auf, die sie in den unterrepräsentierten Anteil (< 1 %) zusammenfasst.

Genome-binning

In Bezug auf der im weiteren Verlauf durchgeführten Metatranskriptom-Analyse erfolgte die Assemblierung individueller (Meta)genom-Bins als Referenz. Im Unterschied zu der taxonomischen Zuordnung durch die Diamond-Datenbank, erfolgt die Bin-Assemblierung aufgrund des Abgleiches kohärenter Sequenzinformationen der *contigs*. Prozessiert durch die in SqueezeMeta eingebetteten Metabat und CheckM Algorithmen wurden fünf Genombins assembliert, die 72,83 % der Metagenom *reads* abdecken. Mit einer Vollständigkeit > 50 % wurden 4 Bins auf Gattungsebene und einer auf Familienebene assembliert. Bei Betrachtung der relativen Abundanz ist ein ähnlicher Trend wie bei den zuvor durchgeführten taxonomischen Untersuchungen ersichtlich. Tab. 17 stellt die Eckpunkte und Statistiken der durchgeführten Assemblierung und des Binnings dar.

Tab. 17: Binning Statistik der fünf erhaltenen taxonomischen Bins.

taxonomische Bins	Länge [bp]	Verunreinigung [%]	Vollständigkeit [%]	Kontamination [%]	reads	
					Anzahl	[%]
f_ <i>Comamonadaceae</i>	3.546.209	0,08	91,56	3,58	1.730.018	5,17
g_ <i>Sporomusa</i>	4.179.737	0,34	89,22	1,70	876.180	2,62
g_ <i>Pseudomonas</i>	7.453.089	0,65	84,39	39,7	339.726	1,01
g_ <i>Clostridium</i>	1.264.037	0	69,46	0,83	668.807	2,00
g_ <i>Geobacter</i>	2.171.900	0	52,33	8,32	20.738.639	62,02

3.1.5.2 Metatranskriptom-Analyse

Um ein tieferes Verständnis der zellulären und physiologischen Prozesse des funktionalen Teils der anodischen Butyrat-Oxidation zu erhalten, wurde eine Transkriptomanalyse durchgeführt. Untersuchungsgrundlage bildete die Elektrode der 7. Generation, wobei 69,84 % der generierten *reads* den fünf assemblierten Genombins zugeordnet werden konnten. In Abhängigkeit der Fragestellung wurden funktionale Biomarker der Butyrat-Oxidation, des Acetat-Metabolismus, des C₁-Metabolismus und anabolische Schlüsselenzyme als Untersuchungsparameter herangezogen. Die in der späteren Analyse identifizierten Hydrogenasen wurden abweichend ihrer funktionalen Annotation durch Abgleich ihrer PFAM-Domänen identifiziert. Potenziell am Elektronentransfer beteiligte c-Typ Cytochrome wurden bioinformatisch identifiziert, wobei Häm-Erkennungssequenzen (CXXCH) der translatierten Gene als Marker dienten. Eine Übersicht der wichtigsten Enzyme und deren Genexpression (in TPM) der jeweiligen Genom-Bins sind in Tab. 18 dargestellt.

Tab. 18: TPM-Werte für die Schlüssel-Biomarker der anodischen Butyrat-Oxidation.

Enzym	Zentrale Oxidationsroute			Extrazellulär Elektronentransfer			C ₁ -Metabolismus		
	Butyrat-Kinase	Phosphat-Butyryltransferase	Citrat-synthase	c-Typ Cytochrome	Flavine	Phenazine	WDL	rTCA	CBB
Genname; KEGG-Annotation	<i>buk</i> ; K00929	<i>ptb</i> ; K00634	<i>cs</i> ; K01647	CXXCH-Motiv	<i>chs</i> ; K00660	<i>phzF</i> ; K06998	<i>acsA/B</i> ; K00192/K00198	<i>porA/B</i> ; K00169-172	<i>RuBisCo</i> ; K01601-2
<i>f_ Comamonadaceae</i>	-	-	3,001	3,321	-	-	-	-	-
<i>g_ Sporomusa</i>	3,057	-	-	6,891	-	-	16,460	-	-
<i>g_ Pseudomonas</i>	0	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>g_ Clostridium</i>	-	0,192	0,561	-	-	-	-	-	-
<i>g_ Geobacter</i>	332,032	153,985	382,553	5553,637	-	-	-	-	-

Tab. 18: fortführend.

Enzym	Acetat-Metabolismus				Wasserstoff-/Formiat-Metabolismus					
	Acetat-Kinase	Phosphat-Acetyltransferase	Acetat:Succinyl-CoA Transferase	Acetyl-CoA Synthetase	Wasserstoff-Konsum			Wasserstoff-Produktion		
Genname; KEGG-Annotation	<i>ack</i> ; K00925	<i>pta</i> ; K00625	<i>ato-1</i> ; K01067	<i>acs</i> ; K01895	<i>hdrABC</i> ; K03388-90	<i>hmdBCD</i> ; K19331	<i>fdhA/B</i> ; K05299/ K15022	<i>mvhDJ</i> ; K14127	<i>hyaA</i> ; K06282	<i>fdh</i> ; K00123
<i>f_ Comamonadaceae</i>	0,189	0,128	-	-	-	0,293	-	-	-	-
<i>g_ Sporomusa</i>	7,784	7,808	-	-	46,375	15,077	5,83	-	-	-
<i>g_ Pseudomonas</i>	0,048	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>g_ Clostridium</i>	2,149	1,371	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>g_ Geobacter</i>	1265,687	502,351	310,468	1115,166	0,437	-	-	6,392	48,956	195,19

Bisher blieb ungeklärt, ob es sich im vorliegenden anodischen Prozess um einen ein- oder mehrstufigen Butyrat-Abbau handelt. Aus diesem Grund fokussierte sich der erste Analysenteil auf die Identifikation der an der Butyrat-Oxidation maßgeblich beteiligten Organismen. Unter Einbezug der Butyrat-Kinase (*buk*), Phosphat-Butyryltransferase (*ptb*) und Citratsynthase (*cs*) sollte so die zentrale Oxidationsroute rekonstruiert werden.

Wie in Tab. 18 dargestellt, wurden für die *buk*, *ptb* und *cs* Expressionsstärken von 335, 154 und 385 TPM ermittelt. Gekennzeichnet durch starke Expressionswerte der *Geobacter*-Gattung, deutet dies auf dessen funktionale Rolle im oxidativen Prozess hin. Naheliegend, dass es sich bei diesen um die Schlüsselorganismen handelt, kann unter Einbezug der am EET beteiligten Multi Häm *c*-Typ Cytochrome (> 5550 TPM) die *Geobacter*-Gattung als alleinige funktionale Schlüsselgruppe des anodischen Prozesses identifiziert werden. Die Suche nach mediator-basierten Elektronentransport-Mechanismen, wie Flavin- oder Phenazin-Synthesewege, blieben ohne Befund. Im Blick auf die weiteren taxonomischen Gruppen wurde eine (im Vergleich) schwache Expression der *buk* (3 TPM) und potenzieller *c*-Typ Cytochromen (6,9 TPM) der *Sporomusa*-Gattung zugeordnet. Die an dieser Stelle unvollständige Rekonstruktion schließt *Sporomusa* als butyrat-oxidierenden Organismus aus, jedoch stellt dessen chemolithotrophe Physiologie einen interessanten Aspekt der Anreicherung dar. Gekennzeichnet durch den reduktiven Acetyl-CoA-Weg (Wood-Ljungdahl) sind Gattungsvertreter zur hydrogenotrophen CO₂-Fixierung befähigt. Dieser nicht-zyklische-CO₂-Fixierungs-Weg ist durch den oxidationsempfindlichen Kohlenmonoxid-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthase-Komplex (*acsA* und *acsB*) gekennzeichnet, der final die gebildeten Methyl- und Carbonyl-Gruppen unter CoA Einbezug zu Acetyl-CoA kondensiert (Breznak, 2006). Der aus zwei unabhängigen Modulen bestehende Komplex wurde mit Expressionswerten von 11,83 und 6,66 TPM alleinig für *Sporomusa* nachgewiesen (Ragsdale, 1997). Auch die nachfolgende Abspaltung der energiereichen Thioester Bindung und Substratkettenphosphorylierung, katalysiert durch die Phosphat-Acetyltransferase (*pta*) und Acetat-Kinase (*ack*) konnte in vergleichbaren Expressionswerten (je, 7,78 und 7,81 TPM) zur *acsA/B* für *Sporomusa* identifiziert werden. Die Untersuchung weiterer autotropher Wege blieb ohne Befund. Ausgehend von einer autotrophen Acetat-Assimilation und dem Ausbleiben einer Acetat-Akkumulation im zeitlichen Verlauf der 7. Generation (Abb. 10 E), stellte sich im Weiteren die Frage nach der Acetat-Dissimilation im Konsortium. Erste Hinweise gab dabei das ermittelte Expressionsmuster der *ack* und *pta*. Die durch die beiden Enzyme klassisch zur Acetat-Dissimilation reversibel ablaufende Reaktion, fiel mit 1265 und 502 TPM für die *Geobacter*-Gattung am stärksten aus.

Auf Grund der Annahme, dass Organismen dieser Gattung maßgeblich an der Acetat-Dissimilation beteiligt sein könnten, erfolgte die Untersuchung weiterer acetat-abbauender Schlüsselschritte. Als Biomarker diente hierbei die Succinyl:Acetat-CoA-Transferase (*ato-1*), welche die reversible CoA-Übertragung zwischen Succinyl-CoA und Acetat katalysiert und die Acetyl-CoA Synthetase (*acs*), welche die irreversible Synthese von Acetyl-CoA unter Verwendung zweier ATP katalysiert, wobei für beide Genprodukte eine starke Expression für die *Geobacter*-Gattung ermittelt wurde (*ato-1*, 310 TPM und *acs*, TPM 1115). Den Befunden zugrunde liegend könnte eine acetat-basierte, syntrophe Wechselwirkung zwischen der *Sporomusa*- und der *Geobacter*-Gattung vorliegen. Zur Aufdeckung von Gruppen die (potenziell) an der Produktion oder Aufnahme von Wasserstoff beteiligt sein könnten, wurden im Weiteren Formiat-Dehydrogenasen und Hydrogenasen als Untersuchungsparameter gewählt. Wie in Tab. 18 dargestellt, wurden vier Hydrogenasen und zwei Formiat-Dehydrogenasen primär für die *Sporomusa*- und *Geobacter*-Gattung identifiziert. Dabei fiel die Expression eines zum HdrABC-homologen Komplexes für *Sporomusa* mit insgesamt 46,4 TPM am höchsten aus. Der in methanogenen und acetogenen Bakterien vorkommende Komplex – aus der A, B, C Untereinheit bestehend – ist maßgeblich an der Reduktion von CO₂ beteiligt (Mock *et al.*, 2014). In Bezug auf den Carbonyl-Zweig des Wood-Ljungdahl Weges wurde eine zum HndBCD-Komplex homologe 4Fe-4S Hydrogenase identifiziert (15,1 TPM), welche als NADP-reduzierende Hydrogenase, NADP für die Reduktion von CO₂ bereitstellt (Poehlein *et al.*, 2012; Wong *et al.*, 2018). Mit einer Expressionsstärke von 5,84 TPM wurde eine Formiat-Dehydrogenase (*fdhA/B*) identifiziert und zeigt dabei vergleichbare TPM-Werte zu den Schlüsselenzymen des Wood-Ljungdahl Weges. Die zwei weiteren Hydrogenasen sind alleinig durch die Expression der *Geobacter*-Gattung gekennzeichnet. Hierbei sticht die HyA-Hydrogenase mit einer Expressionsstärke von 48,96 TPM hervor. In einer erst kürzlich veröffentlichten Studie wird dessen Hochregulation in *G. sulfurreducens* zur Bewerkstelligung eines Überschussmetabolismus gedeutet (Mollaei *et al.*, 2021). Im Weiteren wurde auch eine MvhDJ-Hydrogenase detektiert (6,39 TPM), die als intrazellulärer Elektronenshuttle zum Elektronentransfer mit einer Formiat-Dehydrogenase in Verbindung stehen könnte (Coppi, 2005). In den vorliegenden Daten konnte eine Formiat-Dehydrogenase (*fdh*) mit Expressionsstärken von 195,42 TPM für die *Geobacter*-Gattung nachgewiesen werden.

Zusammenfassend ermöglichte die durchgeführte Metatranskription-Analyse einen mechanistischen Einblick in die physiologischen Zusammenhänge der Butyrat-Oxidation.

3.2 Untersuchung der mikrobiellen Interaktion

Im Rahmen der durchgeführten Transkriptomanalyse wurde eine *Geobacter*-Gattung als funktionale Schlüsselgruppe der anodisch getriebenen Butyrat-Oxidation identifiziert. Einen weiteren Aspekt stellt die Ko-Existenz einer *Sporomusa*-Gattung dar, welche auf eine „*Geobacter*-seitige“ Wasserstoffproduktion resultierend aus einem Überschuss-Metabolismus hindeutet. Der allgemein als Überschuss-Metabolismus bezeichnete Zustand, stellt ein in Eu- und Prokaryoten beobachtetes physiologisches Phänomen dar (Szenk *et al.*, 2007). Mechanistisch erfolgt trotz ausreichender Elektronenakzeptor-Kapazität eine unvollständige Substratoxidation, wobei Acetyl-CoA unter Generation eines ATP-Moleküls zu Acetat katalysiert wird (Szenk *et al.*, 2017). Im Falle des butyrat-oxidierenden Konsortiums könnte von einer gehemmten extrazellulären Elektronenübertragung ausgegangen werden, die sich im weiteren Verlauf auf einen gedrosselten Butyrat-Abbau niederschlägt. Zur näheren Aufklärung des Effekts, sollte durch die Zugabe eines biologischen Mediators die möglichen Ursachen näher untersucht werden. Als Mediator diene dabei das δ -Proteobakterium *G. sulfurreducens*, das neben Acetat auch Wasserstoff zur Reduktion von Elektroden nutzt. Weitere Studien zeigen auch, dass die Zugabe von *G. sulfurreducens* die respiratorische Kapazität zwischen Mikroorganismen und Elektrode verbessern kann (Schmidt *et al.*, 2018).

Für die experimentelle Umsetzung diente die 7. Transfergeneration, wobei Ansätze mit und ohne die Zugabe von *G. sulfurreducens* (OD₆₀₀ 0,1) verglichen wurden. Die resultierenden Aufzeichnungen der Stromdichten und Butyrat-Abnahme sind aus Abb. 29 (Anhang) zu entnehmen. Um eine bessere Vergleichbarkeit der beiden Bedingungen zu gewährleisten, wurde die Butyrat-Abbau-Kinetik, die mittlere Stromdichte und die CE ermittelt (Abb. 14).

Beginnend mit der ermittelten Butyrat-Abbauraten sind zwischen beiden Ansätzen keine deutlichen Unterschiede zu beobachten – sowohl für das Konsortium ohne *G. sulfurreducens* (Bo - 0,31 mM/d) Zugabe als auch mit (Bo+Gs - 0,29 mM/d) trat keine Verbesserung der anodischen Butyrat-Oxidation auf (Abb. 14 A). Im Gegensatz sind beim Vergleich der mittleren Stromdichte deutlichere Unterschiede zu beobachten. Mit 42,92 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ für den Bo Ansatz und 58,91 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ für den Bo+Gs Ansatz, deutet die Zugabe von *G. sulfurreducens* auf einen effizienteren Elektronentransport hin (Abb. 14 B). Dies kann auch anhand der ermittelten CE beobachtet werden (Bo – 80 %, Bo+Gs – 105 %, Abb. 14 C).

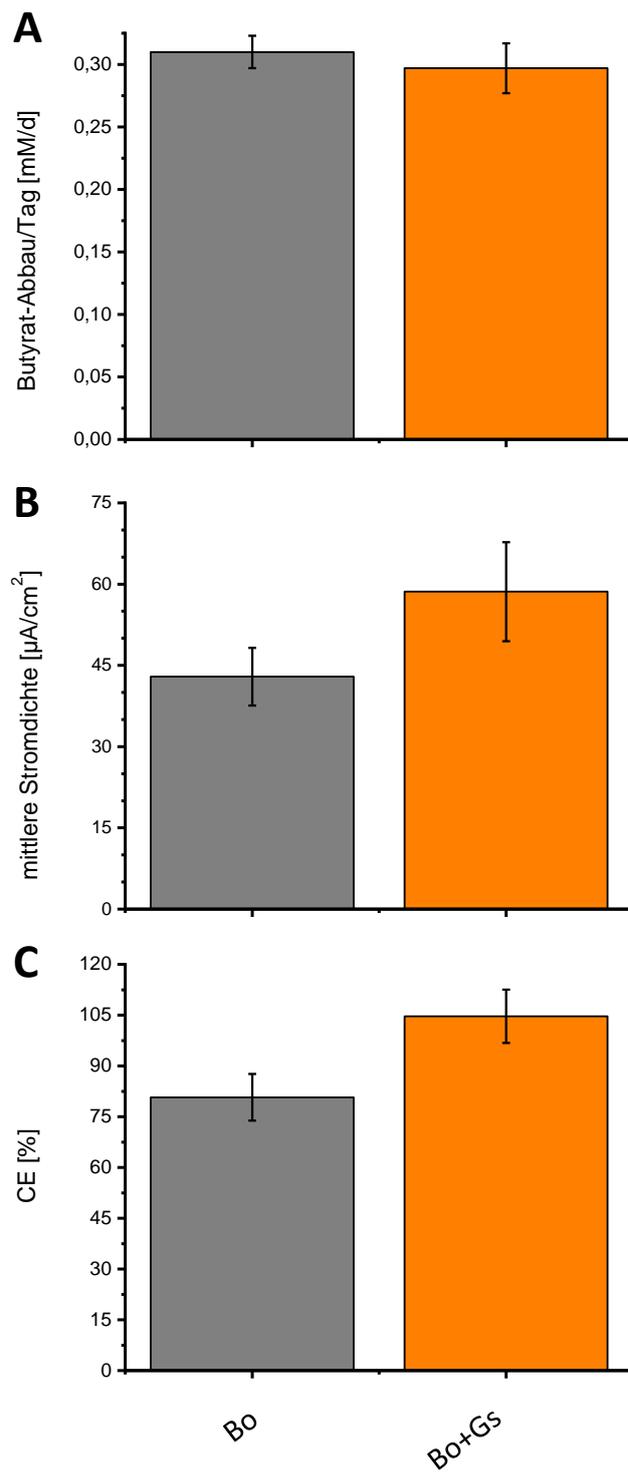


Abb. 14: Mikrobielle Interaktion mit und ohne die Zugabe von *G. sulfurreducens*. Gezeigt ist die A) Butyrat-Abbauraten pro Tag (mM/d), die B) mittlere Stromdichte ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$) und C) Coulomb'sche Effizienz (CE) in % für die Ansätze der butyrat-oxidierenden Gemeinschaft ohne und mit der Zugabe von *G. sulfurreducens* (Bo+Gs).

3.3 Charakterisierung der Hydrolyseflüssigkeit

Die Leistungsfähigkeit bioelektrochemischer Prozesse hängt neben der metabolischen Vielfältigkeit der verwendeten Organismen auch von deren physiologischem Zustand ab. In den folgenden Abschnitten sollte die Zusammensetzung der verwendeten Hydrolyseflüssigkeit analysiert und deren Einfluss auf die mikrobielle Physiologie näher untersucht werden.

3.3.1 Initialer Wachstumsversuch

In einem initialen Experiment wurde die physiologische Toleranz des Laborstammes *G. sulfurreducens* in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen an Hydrolyseflüssigkeit untersucht. Im Flaschenmaßstab wurde Wachstumsmedium mit verschiedenen Konzentrationen an Hydrolyseflüssigkeit versetzt und anschließend mit 10 mM Acetat und 40 mM Fumarat als Elektronendonator und -akzeptor komplementiert. Die Ansätze wurden mit einer einheitlichen optischen Dichte gestartet und das Wachstum über 11 Tage hinweg beobachtet (Abb. 15). Hierbei zeichnete sich für den 25 % (v/v) Ansatz ein nach 4 Tagen beginnendes Wachstum ab, das nach ca. 8 Tagen sein Maximum erreichte. Für höhere Konzentrationen (50, 75 und 90 %) wurde kein Wachstum beobachtet, das auf eine konzentrationsabhängige hemmende bis toxische Wirkung der Hydrolyseflüssigkeit deutet.

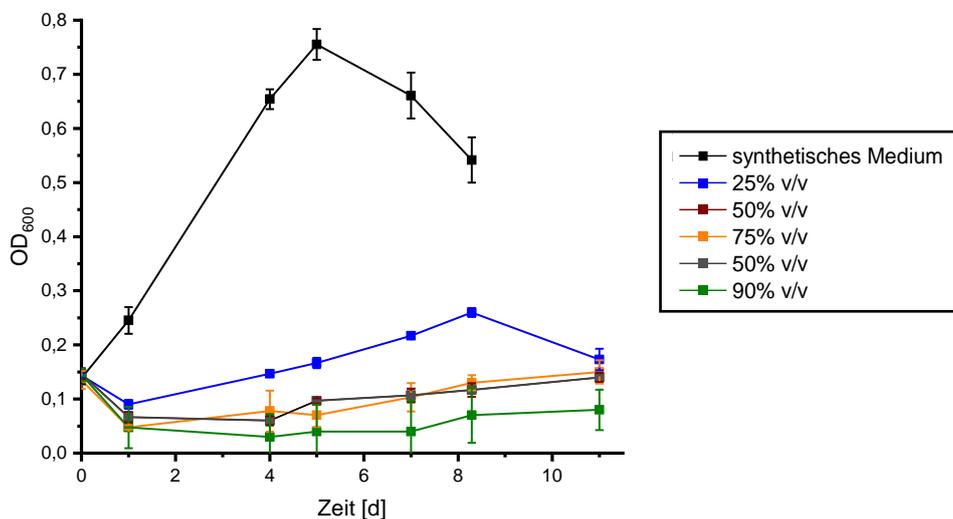


Abb. 15: Physiologischer Einfluss verschiedener Konzentrationen von Hydrolyseflüssigkeit auf den Laborstammes *G. sulfurreducens*. Das Zellwachstum (OD_{600}) des Laborstammes wurde in Abhängigkeit verschiedener Hydrolyseflüssigkeit zu Medium Konzentrationen in % (v/v) über die Zeit hinweg analysiert. Unter allen Bedingungen wurden 10 mM Acetat als Elektronendonator und 40 mM Fumarat als -akzeptor zugegeben. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der biologischen Triplikate.

Die bis dahin ungeklärte Zusammensetzung der Hydrolyseflüssigkeit veranlasste im weiteren Schritt eine analytische Charakterisierung zur Aufdeckung potenzieller Störstoffe.

3.3.2 Analytische Charakterisierung der Hydrolyseflüssigkeit

Auf Grundlage einer TOC, HPLC und IC-Analyse wurden die organischen, anorganischen und ionischen Bestandteile der Hydrolyseflüssigkeit untersucht. In Tab. 19 und Tab. 20 sind die Zusammenfassungen der Analysen dargestellt. Die Untersuchung des Gesamt-Kohlenstoffanteils ergab, dass der organische Teil die Phase dominiert, während der anorganische Teil und der Gesamt-Stickstoffanteil nur einen geringen Anteil einnehmen. Durchgeführte HPLC-Analysen bestätigten die Erwartung, dass die organischen Säuren Acetat, Propionat und Butyrat in erhöhten Konzentrationen vorliegen (Ali *et al.*, 2020). In Bezug auf den Gesamtkohlenstoffgehalt dominierten die organischen Säuren mit 71 % des Gesamt-Kohlenstoffanteils. Die Untersuchung der ionischen Zusammensetzung zeigte eine überdurchschnittlich hohe Konzentration an Natrium, während biologische Hemmstoffe wie Schwermetalle als auch alternative Elektronenakzeptoren (Nitrat, Sulfat) im physiologischen Rahmen für *G. sulfurreducens* lagen.

Tab. 19: Zusammenfassung der chromatographischen Untersuchungen der Hydrolyseflüssigkeit.

TC-Analyse [g/l]	TC	TOC	TIC	TN
	24,86	24,74	0,1204	0,931
VFA [mM]	Acetat 122,41	Propionat 60,12		Butyrat 65,23
DOC _{VFA} /DOC [%]	29,21	19,40		22,96

Tab. 20: IC-Analyse der Hydrolyseflüssigkeit. Dargestellt sind die ermittelten Konzentrationen der untersuchten Anionen und Kationen.

Anionen		Kationen	
Ion	[mM]	Ion	[mM]
Cl ⁻	99,1	Al ³⁺	0,01
PO ₄ ³⁻	21,4	Cr ³⁺	0,01
SO ₄ ²⁻	12,2	Cu ²⁺	0
		Fe ³⁺	0,09
		Ni ⁺	0
		Zn ²⁺	0,54
		K ⁺	16,60
		Na ⁺	4760

Da bis dato ungeklärt ist, inwieweit die hohe Konzentration an organischen Säuren und Natrium die Physiologie des Laborstammes beeinträchtigen, sollte im Weiteren deren Einfluss unter synthetischen Bedingungen untersucht werden.

Synthetische Störstoffe – organischen Säuren

Um die Hypothese einer säure-induzierten Wachstumshemmung zu simulieren, wurde synthetisches Wachstumsmedium mit Acetat, Propionat und Butyrat versetzt. Angelehnt an die in Abschnitt 3.3.1 getesteten Hydrolyseflüssigkeit-zu-Medium Verhältnis (10, 25, 50 % v/v) wurde die Physiologie in Abhängigkeit von je 10, 25 und 50 mM des Säuregemisches untersucht. Die Kultivierung erfolgte erneut im Flaschenmaßstab über 7 Tage (Abb. 16). Hierbei zeichnete sich eine mit steigender Säurekonzentration zunehmende Wachstumshemmung ab.

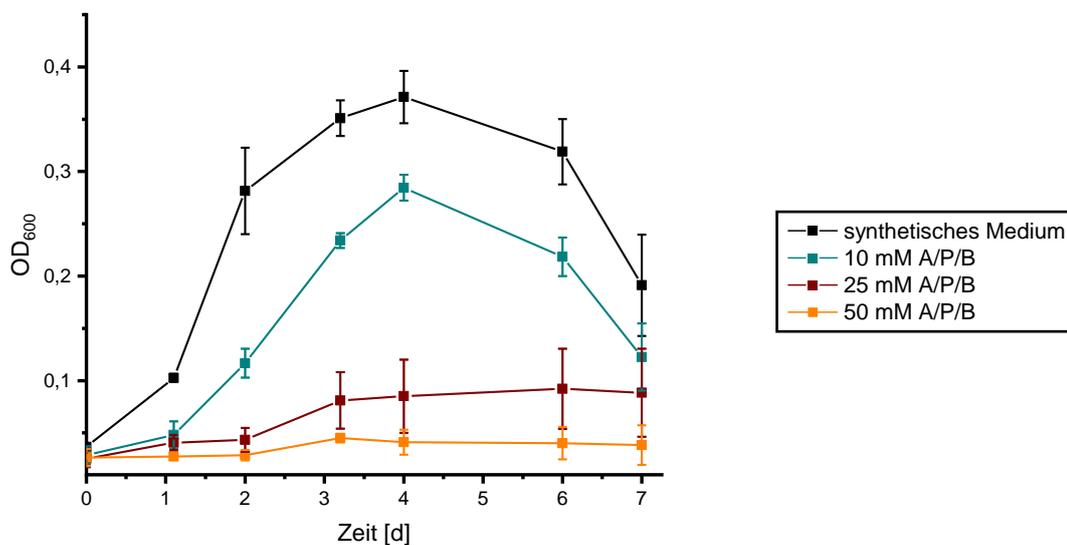


Abb. 16: Zellwachstum von *G. sulfurreducens* in Abhängigkeit eines Gemisches aus Acetat, Propionat und Butyrat. Das Zellwachstum (OD_{600}) wurde über den zeitlichen Verlauf analysiert. Die Ansätze erfolgten im biologischen Triplikate.

Während für den 10 mM Ansatz ein zur Positivkontrolle vergleichender Wachstumstrend zu erkennen ist, ist für den 25 mM und 50 mM Ansatz ein hemmendes bis toxisches Wachstumsverhalten zu beobachten. Zur Untersuchung, ob ein synergistischer Effekt der drei Säuren vorliegt, oder die Anwesenheit einzelner Säuren Einfluss nimmt, wurde nachfolgend auch die individuelle Anwesenheit getestet. Folgend der zuvor getesteten Bedingungen wurde die Untersuchung mit 10, 25 und 50 mM der jeweiligen Säuren wiederholt und zusätzlich die Wachstumsrate (μ [h^{-1}]) bestimmt (Abb. 17).

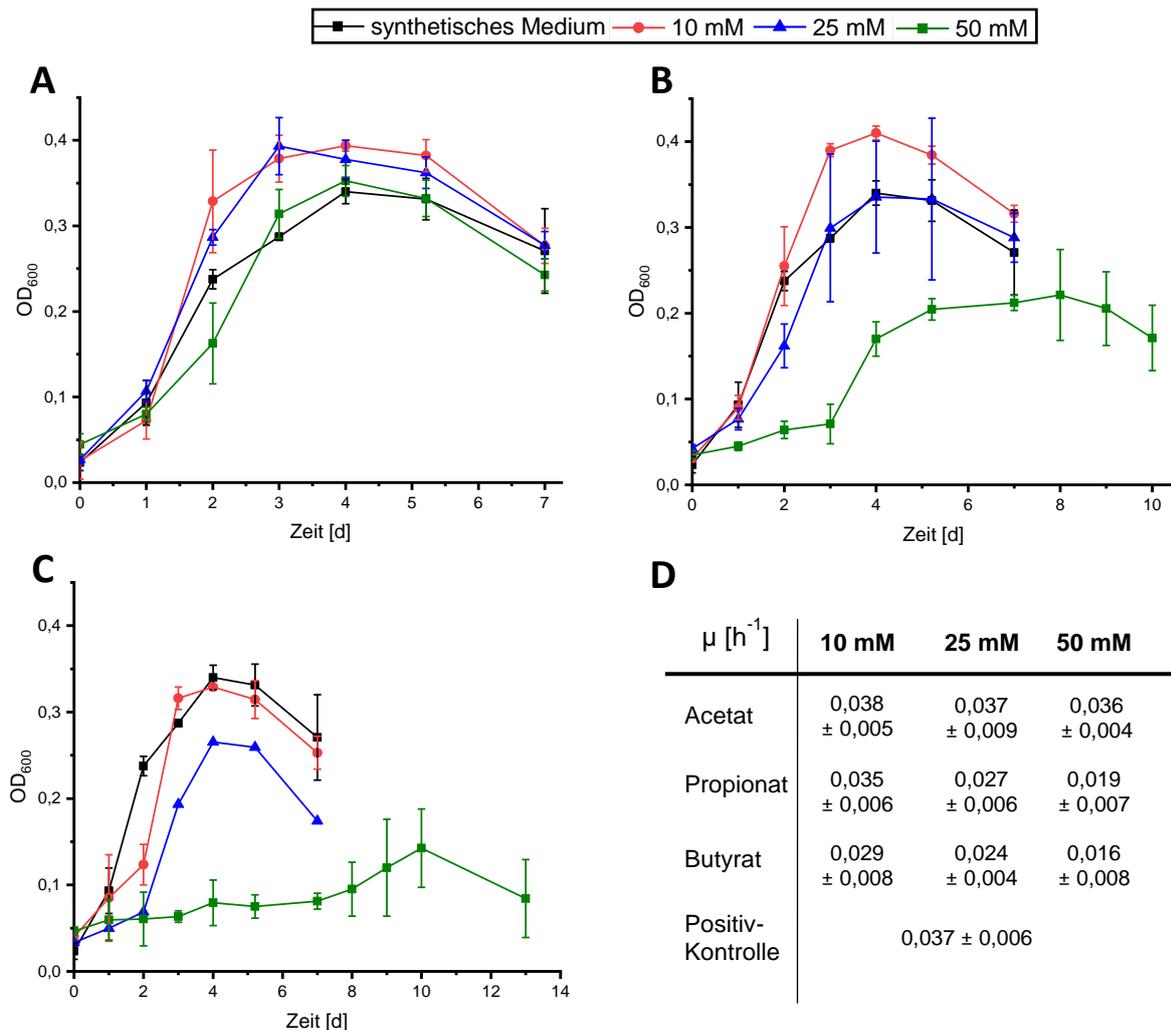


Abb. 17: Physiologischer Einfluss der drei Carboxylsäuren auf den Laborstamm *G. sulfurreducens* in Abhängigkeit verschiedener A) Acetat-, B) Propionat- und C) Butyrat-Konzentrationen. Das jeweilige Zellwachstum (OD_{600}) wurde über die Zeit analysiert und D) die Wachstumsrate berechnet. Die Ansätze erfolgten im biologischen Triplikat.

Während sich für die getesteten Acetat-Konzentrationen kein signifikanter Unterschied abzeichnete, ist für Propionat-Konzentrationen ≥ 50 mM eine verlängerte Verzögerungsphase als auch eine geringere optische Dichte zu beobachten. Den größten Einfluss hatte Butyrat, wobei für 25 mM eine hemmende Wirkung und 50 mM eine deutliche Wachstumseinschränkung zu beobachten war.

Synthetische Störstoffe – Ionen

Ein weiterer Störfaktor könnte die detektierte Natriumkonzentration (400 mM, Tab. 20) darstellen. Den getesteten Hydrolyseflüssigkeit-zu-Medium Abstufungen folgend wurde der physiologische Einfluss in Abhängigkeit von 50, 100 und 150 mM Natrium untersucht (Abb. 18 A). Erwartungsgemäß zeigte sich auch hier mit steigender Natriumkonzentration ein gehemmt bis unterdrücktes Wachstumsverhalten, was sich auch in der Wachstumsrate widerspiegelte (Abb. 18 C).

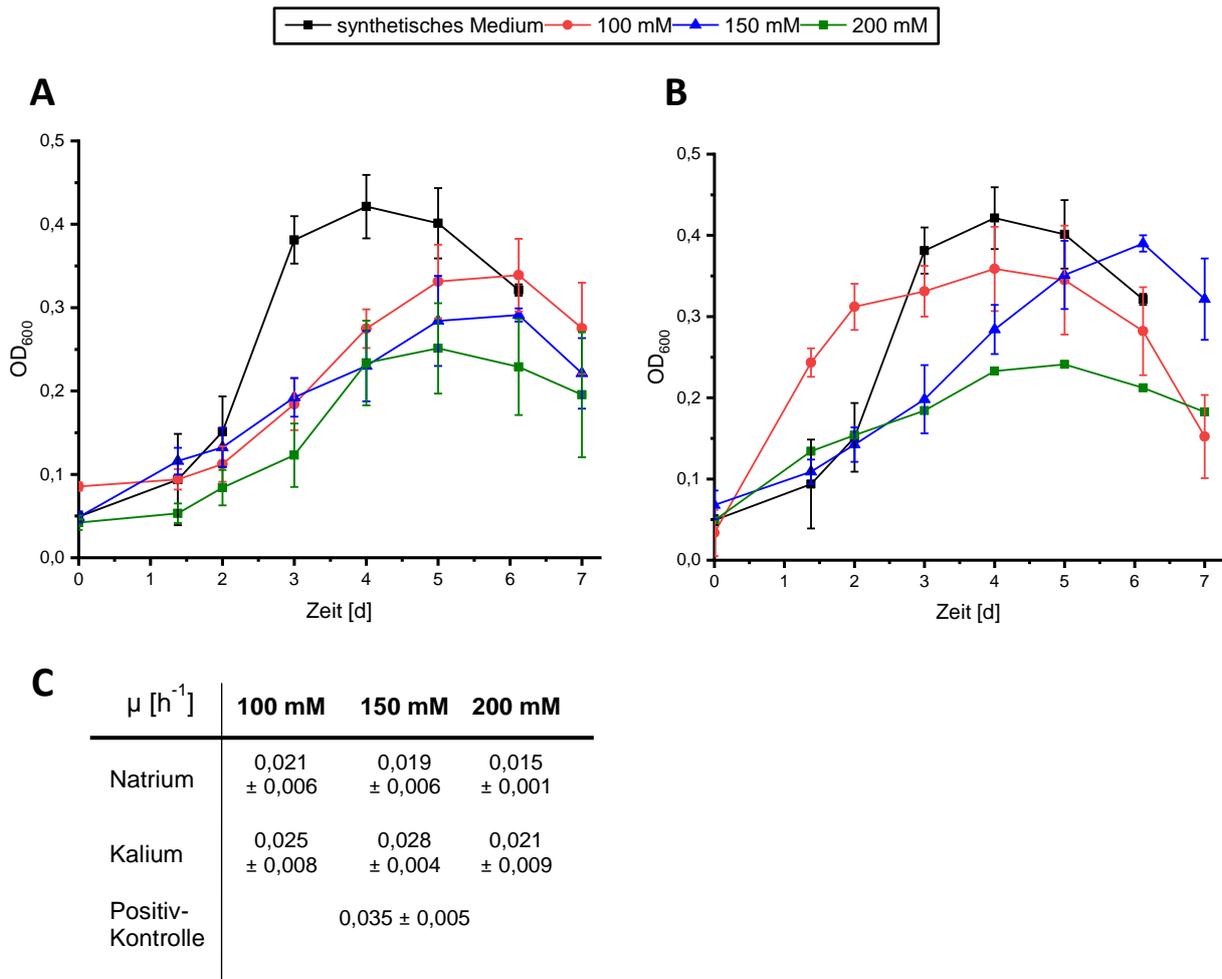


Abb. 18: Physiologischer Einfluss von einwertigen Ionen auf den Laborstamm *G. sulfurreducens*. Das Zellwachstum des Laborstammes (OD_{600}) wurde in Abhängigkeit verschiedener A) Natrium- und B) Kalium-Konzentrationen untersucht. Die jeweiligen C) Wachstumsraten [h^{-1}] wurde nach der Vorgehensweise in Abschnitt 2.17.2 bestimmt.

BES-basierte Vorexperimente mit Hydrolyseflüssigkeit führten durch die nötige N_2/CO_2 -Begasung zu einem drastischen Abfall des pH-Wertes (Anhang Abb. 30). Um diesem Abfall entgegenzuwirken, sollte nach einer geeigneten Titrationsbase gesucht werden. Da hohe Konzentrationen an Natrium bereits vorlagen und eine weitere Steigerung zunehmend toxische Effekte herbeiführen würde, wurde der Einfluss von Kalium als Alternative untersucht. Erneut im Flaschenmaßstab durchgeführt, wurde das im Wachstumsmedium befindliche Natrium durch Kalium (100, 150 und 200 mM) ersetzt und die Ansätze mit *G. sulfurreducens* beimpft (Abb. 18 B). Im Gegensatz zu den getesteten Natriumkonzentration zeichnete sich für 100 mM Kalium ein verbessertes Wachstum ab, während für Konzentrationen ≥ 150 mM eine zunehmende Einschränkung festgestellt wurde.

3.4 Prozessstrategie Durchflussadaptation

In der vorgegangenen Untersuchung wurde ein toxischer Einfluss der Hydrolyseflüssigkeit auf den Laborstamm *G. sulfurreducens* beobachtet. Die analytischen Untersuchungen deckten dabei einen hohen organische Säureanteil sowie dominierende Natriumkonzentrationen auf, die final als konzentrationsabhängige Störfaktoren identifiziert wurden. In Anbetracht der anodischen Elimination stellen die Befunde limitierende Faktoren dar, die neben der mikrobiologischen Physiologie auch die Umsetzbarkeit des Gesamtprozesses gefährden. Da exoelektrogene Mikroorganismen zur Ausbildung von Biofilmen neigen und bekannt ist, dass diese Aggregation Organismen vor toxischen Umgebungsreizen schützt, sollte im Weiteren eine bioelektrochemische Adaptations-Strategie zur Überwindung limitierender Faktoren verfolgt werden. Die Kombination aus Voradaptation und kontinuierlichem Durchfluss sollte eine Gradienten-gestützte Anpassung ermöglichen, die in physiologisch robusteren Eigenschaften resultieren. Zur Umsetzung wurde der Laborstamm in synthetischem Medium adaptiert (Batch-Mode). Nach 5 Tagen folgte ein kontinuierlicher Hydrolyseflüssigkeit-zu-Medium-Austausch. Der Austausch erfolgte mit 50 %-ig (v/v) verdünnter Hydrolyseflüssigkeit und einer hydraulischen Verweilzeit (HRT) von 12,5 Tagen. Die Erweiterung des Systems mit einem pH-Monitoring Modul diente der automatisierten Erhaltung des physiologischen Bereichs (pH 7, Titrationsbase 1 M KOH). In Abb. 19 sind die jeweiligen Prozessphasen, die aufgezeichnete Stromdichtenverläufe und die zufluss-abhängige Substratveränderung dargestellt. Nach dem Start des Durchflusses (Tag 0) stabilisierte sich der Stromdichtenverlauf ab Tag 4 auf ca. $170 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ und sank anschließend mit zunehmendem Volumenaustausch auf ca. $160 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ab. Mit vollständigem Austausch an Tag 17 ist ein stabiler elektrischer Verlauf trotz hoher Säurekonzentrationen zu beobachten.

Eine darauffolgende Verfünffachung der HRT auf 2,5 Tage (ab Tag 17) führte zu keinem weiteren Einbruch der Stromdichte. Auf Grund der ausbleibenden Acetat-Oxidation in den Durchflussphasen, war die Ermittlung der CE nur für die Voradaptations-Phase möglich (CE - 83 %). Dennoch zeichnet sich in Anbetracht der mittleren Stromdichte nur eine geringe physiologische Einschränkung trotz hoher Säurekonzentration ab (Voradaptation - $188 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, HRT 12,5 - $175 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, HRT 2,5 - $160 \mu\text{A}/\text{cm}^2$).

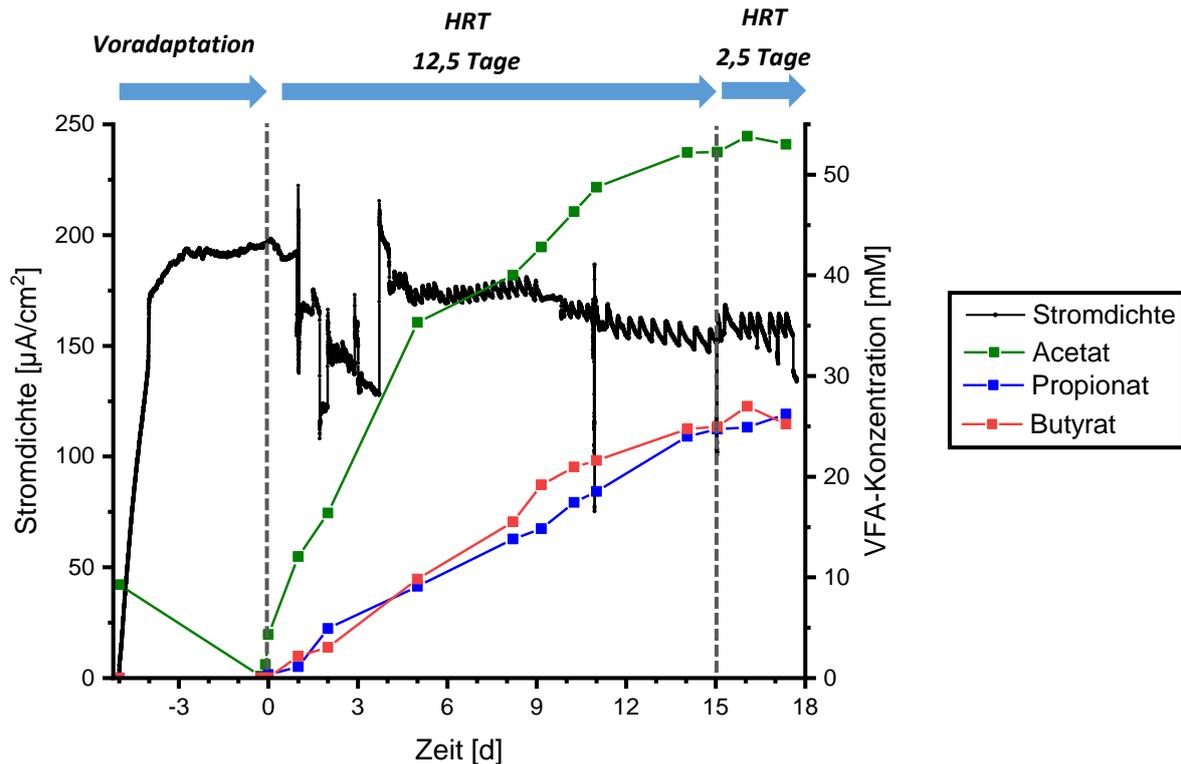


Abb. 19: Bioelektrochemische Adaptation von *G. sulfurreducens* an Hydrolyseflüssigkeit im System nach Golitsch (2016). Gezeigt ist der Stromdichtenverlauf (linke Y-Achse, $\mu\text{A}/\text{cm}^2$) und VFA-Konzentration (rechte Y-Achse, mM). Die Abgrenzung der Prozessphasen sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet und untergliedern sich in die: Voradaptation in synthetischem Medium (Tag -5 bis 0), erster Hydrolyseflüssigkeit-zu-Medium-Austausch mit einer HRT von 12,5 Tagen (Tag 0 bis 15) und einer zweite Austausch-Phase mit einer HRT 2,5 Tagen (Tag 15 bis 17). Die temporär auftretenden Stromdichtenspitzen bzw. Schwankungen sind auf die automatisierte pH-Anpassung zurückzuführen. Die Untersuchung wurde bei einem Potential von 0 mV vs. SHE, 30 °C und konstanter N_2/CO_2 -Begasung durchgeführt.

3.5 Anodische Elimination von Acetat und Butyrat im FPC-System

Wie zu Beginn genannt, ist die Effizienz bioelektrochemischer Prozesse sowohl durch die Wahl geeigneter Organismen als auch durch deren räumlich-deckender Anordnung bestimmt. Unberücksichtigt der identifizierten Prozessfaktoren wurden im Weiteren die erarbeiteten Erkenntnisse zusammengeführt und auf ein neuartiges Fließzellen-System übertragen. Das im Zuge einer interdisziplinären Kooperation konzipierte *Flat-Plate-Cell* System stellt ein klassisches zwei-Kammer-Systemen dar, wobei anodisches und kathodisches Kompartiment durch eine Membran getrennt sind. Der Vorgehensweise aus Abschnitt 3.2 folgend, diente die 7. Generation des Butyrat-Konsortiums unter der Zugabe von *G. sulfurreducens* ($\text{OD}_{600} = 0,1$) als Inokulum. Die Untersuchungen erfolgten im rezirkulierenden Betrieb mit einer Flussrate von 20 ml/min für das anodische und 10 ml/min für das kathodische Kompartiment. Als Elektrolyt diente in beiden Kompartimenten Butyrat-Medium, das zusätzlich mit 10 mM Acetat und Propionat ergänzt wurde.

Analog zu der vorherigen Prozessstrategie (vgl. Abschnitt 3.4) erfolgte eine initiale Anhaftungsphase unter synthetischen Bedingungen (rezirkulierender Betrieb) – gefolgt von einem Gradienten-basierten Hydrolyseflüssigkeit zu Medium Austausch (HRT 12,5 Tage). Dem Austauschzyklus folgte der erneute rezirkulierende Betrieb. In Abb. 20 sind die Prozessphasen, aufgezeichneten Stromdichten sowie detektierten Säurekonzentrationen dargestellt.

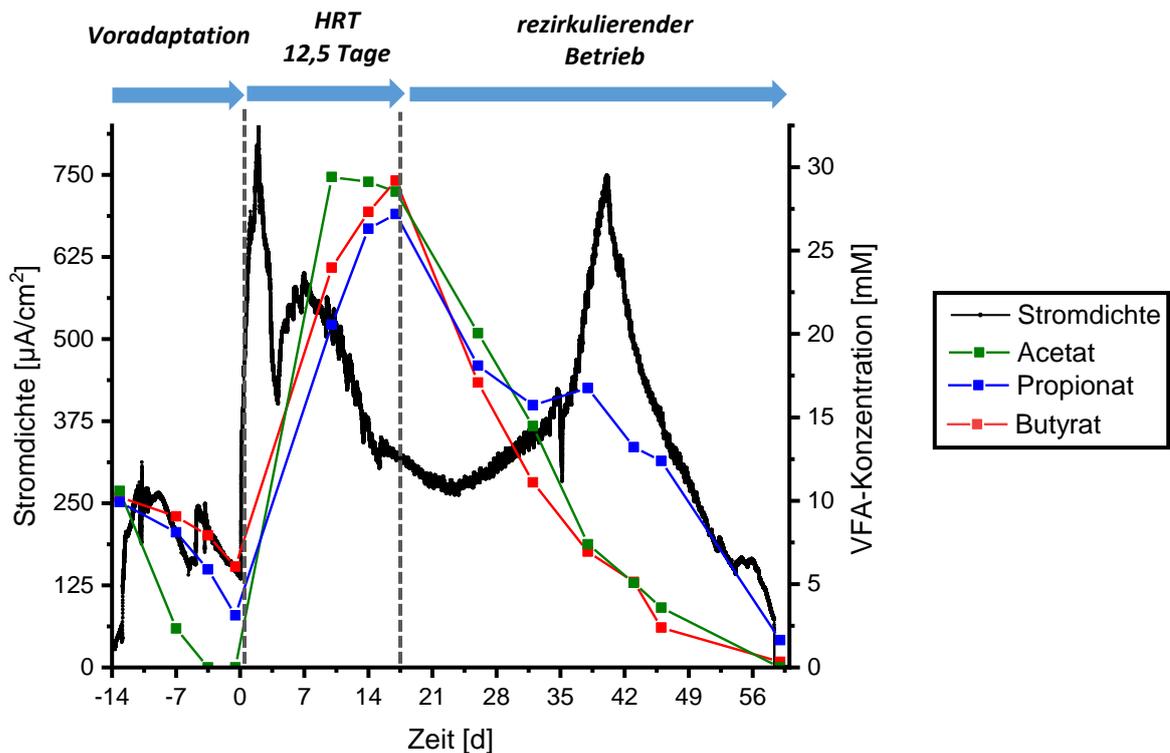


Abb. 20: Bioelektrochemische Abreinigung von Hydrolyseflüssigkeit durch *G. sulfurreducens* und butyrat-oxidierendem Konsortium im FPC-System. Gezeigt ist der Stromdichtenverlauf (linke Y-Achse, $\mu\text{A}/\text{cm}^2$) und die VFA-Konzentration (rechte Y-Achse, mM). Die Prozessphasen sind durch gestrichelte Linien abgegrenzt und untergliedern sich in die: Voradaptation (synth. Medium Tag -14 bis 0), Hydrolyseflüssigkeit-zu-Medium-Austausch mit einer HRT von 12,5 Tagen (Tag 0 bis 17) und einem rezirkulierenden Betrieb (Tag 17 bis 59). Die temporär auftretenden Stromdichtenspitzen bzw. Schwankungen sind auf die automatisierte pH-Anpassung zurückzuführen. Die Untersuchung wurde bei einem Potential von 0 mV vs. SHE, 30 °C und konstanter N_2/CO_2 -Begasung der anodischen Kammer durchgeführt.

Beginnend mit der Anhaftungsphase ist die Abnahme aller drei Säuren korrelierend mit einem elektrischen Stromertrag zu beobachten. Nähere Beobachtungen zeigten eine bevorzugte Acetat-Abnahme, die mit Stromdichten von bis zu $270 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ einhergeht. Der vollständige Acetat-Abbau ist durch einen kurzzeitigen Stromeinbruch gekennzeichnet (Tag -6), dem ein verstärkter Propionat-Abbau folgt. Dem erneuten Anstieg der Stromdichte auf $243 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Tag -5) folgt ein erneuter Abwärtstrend. Mit dem Beginn der Durchflussphase (HRT 12,5 Tage, Tag 0) steigt die Stromdichte kurzzeitig auf ca. $805 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ an und sinkt anschließend bis zum vollständigen Volumenaustausch (Tag 17) auf ca. $300 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ab.

Die organische Säurekonzentration nimmt etwa mit steigendem Volumenaustausch zu, jedoch ist zu keinem Zeitpunkt des Gradienten die in der Hydrolyseflüssigkeit befindliche Acetat-Konzentration von 60 mM zu beobachten. Mit der Umstellung auf den rezirkulierenden Betrieb an Tag 17 sollte zuletzt die Abbaurate und Substratspezifität untersucht werden. Hierbei ist bis Tag 32 ein Abbau aller Säuren zu beobachten, der zu keiner Stromdichtensteigerung führt. Nachfolgend zeichnet sich eine Aufspaltung der Abbauordnung ab, wobei Propionat für 6 Tage konstant im System verbleibt (Tag 32 bis 38). Mit steigendem Acetat- und Butyrat-Abbau ist auch ein erneuter Propionat-Abbau (Tag 37 folgend) zu beobachten. Durch den vollständigen Abbau der Säuren kam der Prozess an Tag 59 zum Erliegen. Zur Evaluation, inwieweit die organischen Säuren als Substrat der anodischen Atmung dienen, wurde der lösliche Kohlenstoffanteil (DOC) als auch der entsprechende Säureanteil (DOC_{VFA}) ausgewählter Proben bestimmt. Deren Verhältnis gibt Aufschluss über die Spezifität des Prozesses.

Wie aus Tab. 21 ersichtlich, zeigte sich hierbei während der Durchflussphase eine Angleichung an die verwendete Hydrolyseflüssigkeit mit gleichbleibendem Säureverhältnis. In der darauffolgenden rezirkulierenden Phase ist ein sinkendes $\text{DOC}/\text{DOC}_{\text{VFA}}$ Verhältnis ersichtlich, das darauf schließen lässt, dass die organischen Säuren als primäres Substrat der anodischen Atmung genutzt werden. Die errechnete CE auf Basis des DOC und DOC_{VFA} bestätigte diese Annahme, da auch hier eine höhere CE aus den VFA (60,09 %) im Vergleich zum Gesamt-DOC (50,89 %) ersichtlich ist.

Tab. 21: Anteil des löslicher Gesamtkohlenstoffes ausgewählter Proben des *FPC*-Experiments.

Modus	Tag	DOC [g/l]	DOC_{VFA} [g/l]	$\text{DOC}_{\text{VFA}}/\text{DOC}$ [%]	CE aus DOC [%]	CE aus DOC_{VFA} [%]
Durchfluss-Phase	0	1,548	0,765	49,41		
	8	6,356	4,394	69,13	x	x
	14	8,611	5,619	65,26		
Rezirkulierende-Phase	17	7,812	5,823	74,54		
	26	5,848	3,709	63,33		
	32	5,502	2,747	49,93	50,89	60,09
	38	4,102	2,117	51,61		
	43	3,598	1,603	44,54		
	59	1,548	0,142	9,16		

3.6 Acetoin-Produktion unter verschiedene Prozessszenarien

Die praktikable Anwendung des angestrebten Prozesses setzt eine biomassen-basierte Veredelung der anodischen Reststoffe in höherwertige Produkte voraus. Die Herausforderungen des Biokatalysators stellen hohe Produktionsraten unter Verwendung nicht definierter Ausgangssubstrate dar. Daher sollte im Weiteren ein durch Windhorst modifizierter Stamm der Gruppe der Knallgasbakterien in Bezug auf dessen Acetoin-Synthese unter verschiedenen Prozessbedingungen und -szenarien evaluiert werden (Windhorst & Gescher, 2019).

Wie in Abschnitt 1.5.2 näher erläutert, umfassen die genetischen Modifikationen des *Cupriavidus necator* H16 Stammes neben der Deletion des *acoABC*-Operons auch die der beiden PHB-Synthase Gene *phaC1* und *phaC2*. Die Integration der Acetoin-Synthesegene *alsS* und *alsD* ermöglichen darüber hinaus die Synthese der Plattformchemikalie Acetoin.

3.6.1 Heterotrophe Acetoin-Produktion

Da *C. necator* H16 ein breites heterotrophes Substratspektrum aufweist, wurde in einer ersten experimentellen Reihe die Eignung der drei Prozesssäuren anhand der Acetoin-Produktion untersucht. Die Kultivierung wurde in Minimal-Medium durchgeführt, wobei 10 mM Acetat, Propionat und Butyrat als Kohlenstoffquelle dienten. Die Ansätze wurden mit einer OD₆₀₀ von 0,05 inokuliert und sowohl das Wachstumsverhalten als auch die Substratabnahme und Acetoin-Produktion über die Zeit hinweg untersucht.

Wie aus Abb. 21 zu entnehmen, wurde mit dem Eintritt in die exponentielle Phase eine simultane Substratabnahme beobachtet. Mit dem vollständigen Abbau der Substrate nach 59 h wurde eine Acetoin-Konzentration von 6,9 mM detektiert.

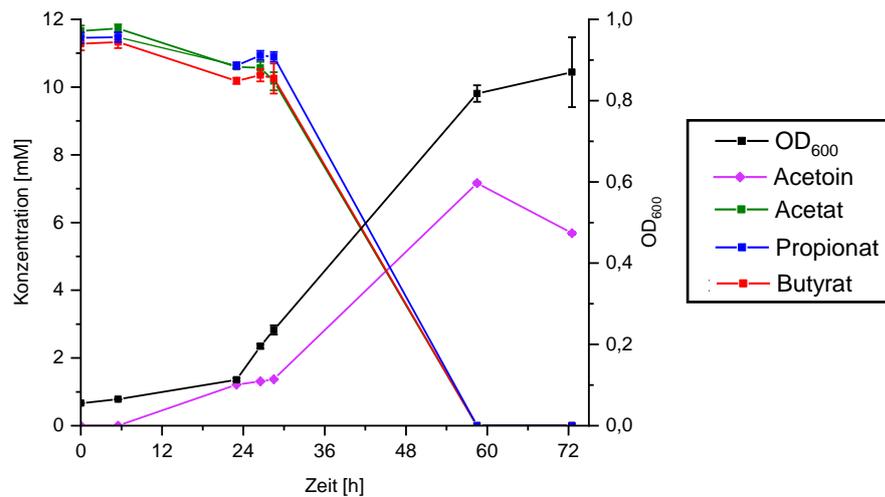


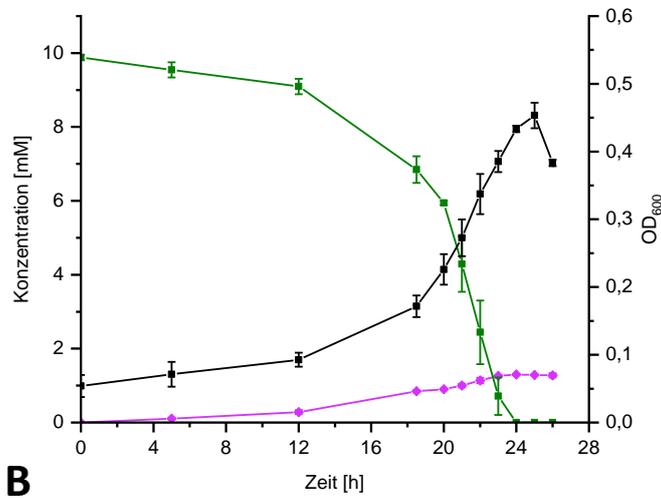
Abb. 21: Heterotrophe Acetoin-Produktion ausgehend von einer Mischung aus Acetat, Propionat und Butyrat. Die drei Carboxylsäuren wurden in gleichen Mengen zugegeben und der Verbrauch sowie das Wachstum (OD_{600}) und die Acetoin-Produktion über die Zeit überwacht. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der drei biologischen Replikate dar.

Im weiteren Schritt wurden die Experimente durch die individuelle Bereitstellung der Carboxylsäuren wiederholt, um mögliche Unterschiede in der Effizienz der Acetoin-Produktion aufzudecken. Wie in Abb. 22 ersichtlich, wurde auch hier der Abbau des jeweiligen Substrats mit dem Eintritt in die exponentielle Phase beobachtet. Im Vergleich wurde Propionat innerhalb von 21 Stunden metabolisiert, gefolgt von Acetat nach 24 Stunden und Butyrat nach 37 Stunden. Auffällig erscheint, dass für Butyrat die höchste optische Dichte erreicht wurde.

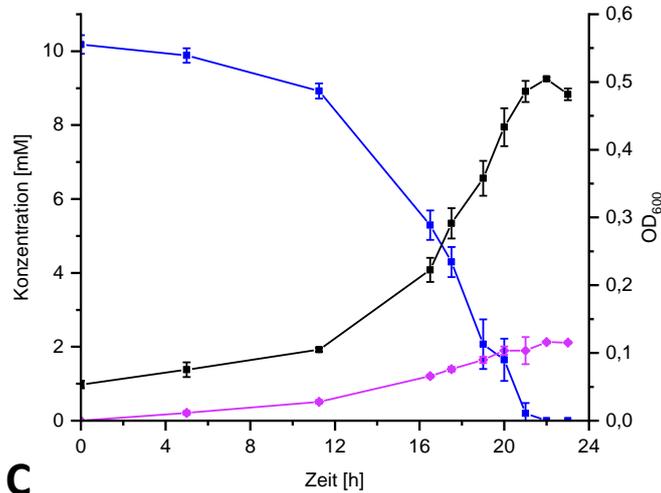
Die höchste Acetoin-Konzentration wurde mit Propionat erreicht (2,11 mM), gefolgt von Acetat mit 1,27 mM Acetoin und Butyrat mit 1,21 mM Acetoin.



A



B



C

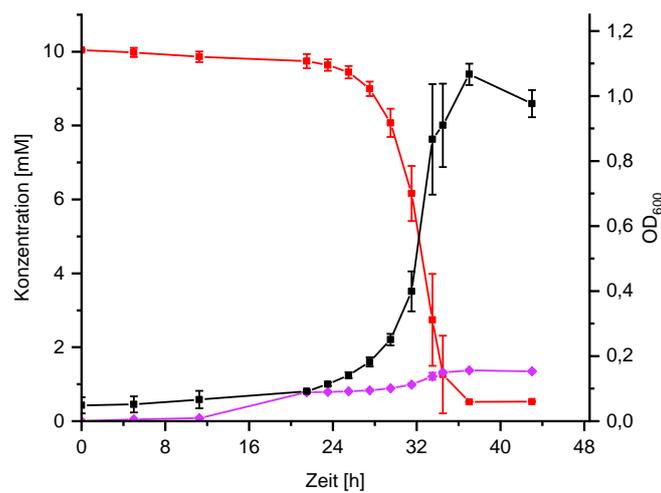


Abb. 22: Heterotrophe Acetoin-Produktion unter individueller Carboxylsäure-Zugabe. Der jeweilige Substratverbrauch von A) Acetat, B) Propionat und C) Butyrat, die Acetoin-Produktion sowie das Zellwachstum (OD₆₀₀) des Produktionsstammes wurden über die Zeit analysiert. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der drei biologischen Replikate dar.

3.6.2 Mixotrophe Acetoin-Produktion

In Anbetracht der Tatsache, dass CO_2 und H_2 sowohl als Nebenprodukt der fermentativen Biomassekonversion als auch in der mikrobiellen Elektrolysezelle entstehen, wurde im Weiteren untersucht, inwieweit mixotrophe Bedingungen die Effizienz der Acetoin-Produktion verändern. Die Kultivierung erfolgte erneut in Minimal-Medium unter Zugabe von 20 mM Acetat, Propionat und Butyrat, wobei zusätzlich eine Gasmischung von 5 % CO_2 , 10 % H_2 und 15 % O_2 beigefügt wurde. Die Ansätze wurden mit einer OD_{600} von 5 gestartet und das Wachstumsverhalten als auch die löslichen und gasförmigen Substrate und Produkte über die Zeit hinweg untersucht. Bei der Bereitstellung eines Gemisches aus allen drei Säuren zeigte der Produktionsstamm einen simultanen Abbau der Säuren mit H_2 und CO_2 , der in einer Acetoin-Konzentration von 10,79 mM (Abb. 23) resultierte.

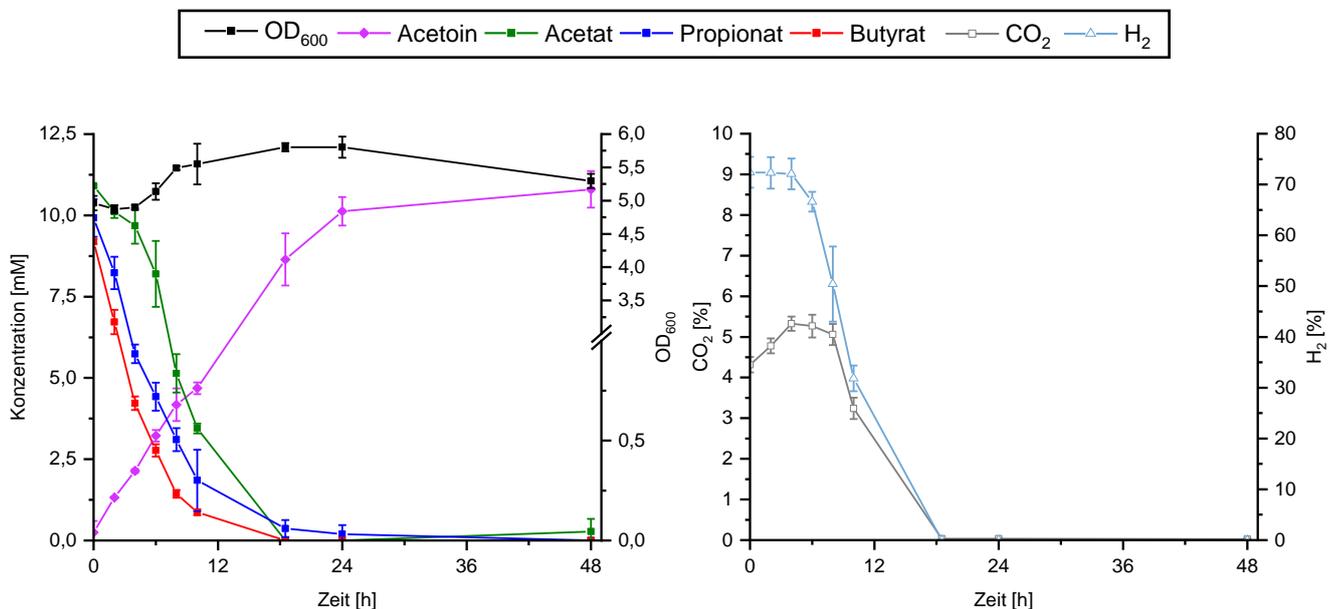


Abb. 23: Acetoin-Produktion unter Verwendung von Acetat, Propionat und Butyrat unter mixotropen Bedingungen. Die Abbildung zeigt die Produktion von Acetoin in Korrelation zum Verbrauch des Carboxylsäuren-Gemischs. Weiterhin wurden die optische Dichte (OD_{600} , linke Abbildungen), sowie der Verbrauch von H_2 und CO_2 (rechte Abbildungen) überwacht. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der drei biologischen Replikate dar.

Für die Bereitstellung der einzelnen Säuren ist zu beobachten, dass der Produktionsstamm Acetat und Butyrat simultan mit Wasserstoff und CO_2 verbrauchte, wohingegen für Propionat ein typisches diauxisches Verbrauchsverhalten auftrat (Abb. 24). Erneut wurde für Propionat die höchste Acetoin-Konzentration ermittelt (20,37 mM), gefolgt von Acetat (3,36 mM) und Butyrat (6,23 mM).

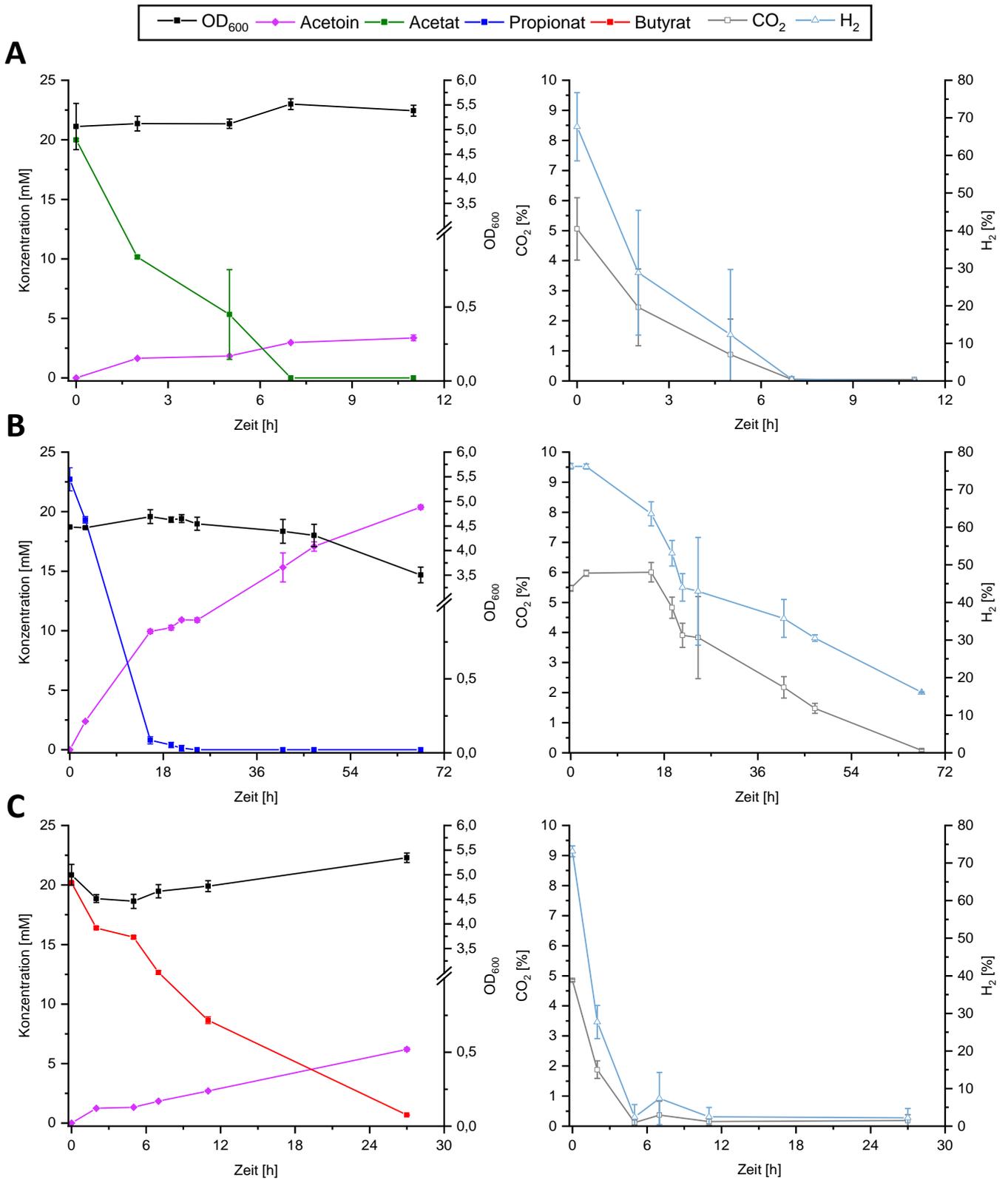


Abb. 24: Mixotrophe Acetoin-Produktion. Der Verbrauch von A) Acetat B) Propionat oder C) Butyrat wurde in Anwesenheit einer CO₂, O₂, H₂ Atmosphäre untersucht. Die linken Abbildungen zeigen den Carboxylsäure-Verbrauch, die Acetoin-Konzentration, und die optische Dichte (OD₆₀₀) über die Zeit. Die Abbildungen rechts zeigen jeweils den Verbrauch von CO₂ und H₂. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der drei biologischen Replikate dar.

4. Diskussion

Vor dem Hintergrund einer zunehmenden Erschöpfung fossiler Ressourcen und deren Stellung im Produktionssektor, richtet sich der Fokus immer mehr auf die Veredelung biogener Reststoffe. Die bisherige Nutzung dieser Ressource beschränkt sich auf nur wenige Produkte, wie Kompost oder Biogas, die in ihrer Gesamtheit einen geringen wirtschaftlichen Wert darstellen (Alibardi *et al.*, 2020). Die Veredelungen in höherwertige Produkte ist zumeist durch die hohe Substratheterogenität und -komplexität limitiert.

Ziel dieser Arbeit war es, eine Bioraffineriestraße zu implementieren, die durch die Verschaltung verschiedener technischer und biologischer Module die Problematik einer unzureichenden stofflichen biotechnologischen Nutzung überwindet und eine wertige Plattformchemikalie als einziges Endprodukt erzeugt. Die Prozessstraße ist initial durch einen Dunkelfermentationsschritt gekennzeichnet, wobei Verfahrensingenieuren der Arbeitsgruppe Horn die Implementierung einer robusten und effizienten Fermentationsstrategie gelang (Ali *et al.*, 2020). Als Resultat wurde ein durch überdurchschnittlich hohe Acetat-, Propionat- und Butyrat-Konzentrationen gekennzeichneter Säureeffluent erzeugt, der in der weiteren Prozessstraße als Substrat in einer mikrobiellen Elektrolysezelle diente. Durch die Wahl geeigneter exoelektrogener Mikroorganismen sollten hier selektiv Acetat und Butyrat aus dem Prozessstrom eliminiert und der resultierende Restfluss in einer finalen Reaktionsstufe mit dem kathodisch erzeugten H_2 biokatalytisch in Acetoin veredelt werden. Im Fokus dieser Arbeit stand die Erarbeitung geeigneter biologischer und substratseitiger Faktoren, die maßgeblich die anodische Oxidationseffizienz beeinflussen. Die nachfolgenden drei Kapitel stellen die durchgeführten Vorgehensweisen näher dar und diskutieren die erbrachten Erkenntnisse.

In den ersten beiden Teilen wird die Herangehensweise der Isolierung und Identifikation einer geeigneten exoelektrogenen Gemeinschaft vorgestellt, gefolgt von der analytischen Charakterisierung substratseitiger Störfaktoren und einer geeigneten Prozessstrategie zur Überwindung dieser Limitierungen. Im dritten Teil wurden die erarbeiteten Erkenntnisse auf ein anwendungsorientiertes Fließzellenmodell übertragen und die Praktikabilität des Gesamtprozesses evaluiert. Abschließend im vierten Kapitel wird ein bereits etablierter Produktionsstamm vorgestellt, der auf Grundlage verschiedener heterotropher und mixotropher Prozessszenarien die biomassenbasierte Acetoin-Synthese erlaubt.

4.1 Anodisches Konsortium

Die Prozessstabilität und Leistungsfähigkeit bioelektrochemischer Prozesse ist neben der physiologischen Eignung der gewählten Organismen auch von deren Substratspezifität abhängig (Yasri *et al.*, 2019). Im Allgemeinen erweisen sich exoelektrogene Reinkulturen als nützlich um die molekularen Hintergründe der Elektronentransfermechanismen aufzudecken, jedoch bildet deren eingeschränkte Anpassungsfähigkeit gegenüber komplexen Substratbedingungen einen entscheidenden Nachteil für anwendungsorientierte Prozesse (Logan *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2012). Die Kombination aus Rein- und Mischkultur kann hingegen die Fusion mehrere Elektronentransfermechanismen ermöglichen, die nicht nur prozessinduzierte Populationsschwankungen kompensieren, sondern auch zusätzlich die Übertragung nicht-exoelektrogen erzeugter respiratorischer Elektronen zur Elektrode ermöglichen (Guang *et al.*, 2020). Das vorteilhafte Zwischenspiel solcher Ansätze spiegelt sich dabei in einer höheren Stromdichte, Coulomb'schen Effizienz (CE) und Langzeitstabilität des Prozesses wieder (Kumar *et al.*, 2016; Logan & Rabaey, 2012). So galt es im ersten Schritt, eine geeignete exoelektrogene Mischkultur butyrat-oxidierender Mikroorganismen aus einer Umweltprobe anzureichern, sodass diese im späteren Verlauf mit *G. sulfurreducens*, die funktionalen Hauptakteure des anodischen Prozesses der anvisierten Reaktionskaskade darstellen.

4.1.1 Anreicherung exoelektrogener butyrat-oxidierender Mikroorganismen

Ein Großteil der Mikroorganismen sind noch immer als nicht kultivierbar einzuordnen, wobei dies weniger deren physiologischer Eigenschaft zuzurechnen ist als vielmehr dem fehlenden Verständnis essenzieller Anreicherungs- und Wachstumsbedingungen (Kabbeck, 2019). Der Großteil der exoelektrogenen Mikroorganismen besiedelt den Untergrund, wobei das niedrige Redoxpotential eine Nische für die Ausbildung dissimilatorischer Eisenreduktionsstoffwechselwege ermöglicht (Fredrickson *et al.*, 2003). Die traditionellste Art der Anreicherung umfasst die Verwendung eisenoxidhaltiger Nährmedien, die die Selektion auf metallreduzierende Organismen erlauben sollte (Zuo *et al.*, 2006). Die bekanntesten exoelektrogenen Vertreter, wie z.B. *G. sulfurreducens* und *S. oneidensis* wurde mit dieser Strategie isoliert und gehören zu den leistungsfähigsten stromproduzierenden Mikroorganismen unserer Zeit (Coaxes *et al.*, 1996; Venkateswaran *et al.*, 1999). Die genannte Anreicherungsstrategie führt jedoch nicht immer zur Isolation stromproduzierender Mikroorganismen – so ist *Pelobacter carbinolicus* etwa zur Fe[III]-Reduktion, jedoch nicht zur Stromproduktion befähigt (Richter *et al.*, 2007).

Im umgekehrten Fall berichten Bretschger und Kollegen (2007) von einer *S. oneidensis* MR-1 Mutante, welche Strom produziert, jedoch die Fähigkeit zur Fe[III]-Reduktion verlor. Diese Gegebenheit deutet auf unterschiedliche Elektronenübertragungsmechanismen hin, wobei die Bedeutung der richtigen Isolationsstrategie exoelektrogener Mikroorganismen für einen späteren bioelektrochemischen Prozess hervorgehoben wird. Daher wurde bei der in Abschnitt 3.1.1 durchgeführten Anreicherung im bioelektrochemischen System auf eine Elektrode als alleinigen Elektronenakzeptor und Butyrat als einzige Kohlenstoffquelle zurückgegriffen. Als Grundmedium diente ein angepasstes *G. sulfurreducens* Anodenmedium, um physiologisch verwandte stromproduzierende Butyrat-oxidierende Mikroorganismen anzureichern. Neben den gewählten Anreicherungskriterien galt es auch, geeignete Umweltproben für die Inokulation zu identifizieren, die sowohl ein Butyrat-Aufkommen als auch eine hohe mikrobiologische Diversität aufweisen. Im Folgenden werden die Probenstandorte und deren Bezug zu exoelektrogenen Mikroorganismen näher erläutert:

Dunggruben weisen eine hohe mikrobiologische und physiologische Diversität auf, welche nicht zuletzt auf das Vorkommen eines breiten Spektrums organischer Verbindungen als Tierkotbestandteil zurückzuführen ist (Yokoyama *et al.*, 2006). Eine dieser Verbindungen ist Butyrat, wodurch die Vermutung nahe lag, dass auch potenzielle Butyrat-Konsumenten vorliegen könnten.

Suboxisches **Sediment** weist ebenfalls eine hohe Vielfalt in Bezug auf die mikrobielle Phylogenie und Physiologie auf. Darüber hinaus ist der anoxische Bereich dieser Standorte mit einem Vorkommen an Redoxmediatoren (Huminstoffe, Metalle) und unlöslicher Partikel assoziiert, wobei Nischen für die Entwicklung extrazellulärer Atmungsvorgänge entstehen können. Auf Grundlage dieser Charakteristika erschien die Isolation eines EET-befähigten Organismus als sehr wahrscheinlich (Doyle & Marsili, 2015).

Einige Studien zeigten auch, dass Industrieabwässer oder **Hydrolyseflüssigkeiten** ein potenzielles Habitat exoelektrogener Mikroorganismen darstellen, da sowohl die Anwesenheit organischer Säuren als auch alternativer Elektronenakzeptoren wie SO_4^{2-} oder NO_3^- gegeben ist (Brunner *et al.*, 2019; Schmidt *et al.*, 2018).

Für die mit den drei Umweltproben inokulierten Systemen wurde nur für die mit Sediment beprobte Zelle ein elektrischer Stromertrag beobachtet, der zusätzlich mit einem exoelektrogenen Butyrat-Abbau korreliert werden konnte (Abb. 7 C). Die anfänglich ermittelte Coulomb'sche Effizienz (CE) von lediglich 3,5 % deutete zunächst auf die Anwesenheit exoelektrogener Atmungsprozesse hin, jedoch auch darauf, dass nicht-exoelektrogene Prozesse

mit der exoelektrogenen Gruppe um das Substrat konkurrieren (Abb.11). Da die Anwesenheit nicht-exoelektrogener Prozesse die Effizienz des angestrebten Prozesses negativ beeinflusst, galt es die exoelektrogenen Vertreter weiter anzureichern. Dazu sollte zunächst deren Lokalität im System bestimmt werden, um anschließend spezifischere Anreicherungsmaßnahmen durchführen zu können. Hierzu wurde das System in das planktonische und sessile Kompartiment unterteilt und diese separiert voneinander untersucht (Abb. 8). Durch die Überführung eines Elektrodenstücks in ein neues System, konnte im Gegensatz zur Übertragung der planktonischen Phase, ein erneuter Stromertrag festgestellt werden, der mit einem exoelektrogenen Butyrat-Abbau korrelierte (Abb. 9). Hierbei wurde die Elektrode als funktionaler Teil des exoelektrogenen Butyrat-Abbaus identifiziert, was im Weiteren durch die Überführung eines Elektrodenstücks verifiziert werden konnte. Die ermittelte höhere CE (10 %, 1. Gen.) im Vergleich zur Vorgängerezelle (3,5 %, Anreicherungszone) deutete auf eine erhöhte exoelektrogene Elektronenübertragung hin, was auf eine Anreicherung der exoelektrogenen Gruppe schließen ließ. Nach der erfolgreichen Lokalisierung der exoelektrogenen Organismen, erfolgte die weitere Anreicherung nach demselben Verfahren, wobei ein Elektrodenstück über sieben Generationen hinweg überführt und der Stromdichtenverlauf und die CE als Anreicherungsmaß dienten. Hierbei wurde mit voranschreitender Generation eine zunehmende Stabilisierung des Stromdichtenverlaufes festgestellt, welche darüber hinaus mit einer Effizienzsteigerung korrelierte.

Die in der 7. Generation ermittelte CE von 84 % lässt darauf schließen, dass die angewandte Strategie zu einer erfolgreichen Verdrängung nicht-exoelektrogener Prozesse führte und die spezifische Anreicherung exoelektrogener Gruppen förderte (Abb. 11). Zusammenfassend konnte durch die gewählten physiologischen Selektionskriterien eine spezifische Anreicherung eines butyrat-oxidierenden strom-produzierenden Konsortiums erreicht werden, das eine potenzielle Eignung für den angestrebten anodischen Prozess aufwies.

Einen aus physiologischer Sicht interessanten Aspekt stellte die mit voranschreitender Generation ausbleibende Acetat-Akkumulation dar. Während in der 2. Generation bis zu 2,5 mM Acetat detektiert wurden, waren es in der 4. Generation nur noch 0,8 mM. In der 5. Generation blieb diese dann vollends aus (Abb. 10 A bis D). Eine Acetat-Akkumulation deutet auf einen syntrophen Abbaumechanismus hin, wobei Butyrat durch Organismen wie *Syntrophomonadaceae* zu Acetat und H₂ metabolisiert wird. Die Schwierigkeit des Abbaumechanismus stellt dessen endergone Reaktionsenthalpie dar (Gl. 1), wobei die Reaktion nur unter der Anwesenheit hydrogenotropher Organismen ablaufen kann.

Hierbei handelt es sich zumeist um methanogene oder acetogene Organismen, die durch den Verbrauch von H₂ und der daraus resultierenden Senkung des Partialdrucks, eine exergone Reaktionsenthalpie ermöglichen (Gl. 2 und 3) (Müller *et al.*, 2010).



Unter der Annahme, dass syntrophe Abbaumechanismen in der durchgeführten Anreicherung eine Rolle spielen, stellte sich im Weiteren die Frage, in welcher Beziehung diese zum exoelektrogenen Butyrat-Abbau stehen. Darauf basierend konnte von zwei verschiedenen Theorien ausgegangen werden:

Für einen **mehrstufigen** Abbauprozess würde Acetat durch die syntrophe Gruppe bereitgestellt werden, was im Weiteren als Substratquelle der exoelektrogenen Gemeinschaft dienen könnte. Die bis zur 4. Generation beobachtete Acetat-Akkumulation könnte durch ein ungleiches Verhältnis der syntrophen und exoelektrogenen Gruppe erklärt werden, wobei die ausbleibende Acetat-Akkumulation ab der 5. Generation durch eine Angleichung beider Gruppen erklärt werden könnte.

Im Gegensatz würde für einen **einstufigen** Abbauprozess syntrophe und exoelektrogenen Organismen um das Substrat (Butyrat) konkurrieren, wobei letztere Gruppe aufgrund einer höheren freien Gibbs-Energie (Butyrat, -605,3 kJ/mol, nach Thauer *et al.*, 1977) die syntrophe Gruppe verdrängen würde.

Eine durchgeführte 16S-Amplikon-Analyse der planktonischen und sessilen Phasen der Generationen bestätigte zunächst, dass weder potenziell syntrophe noch methanogene Organismen angereichert wurden. Dies deutete auf einen einstufigen Abbauprozess hin, der im Weiteren durch die Anreicherung potenzieller exoelektrogener Organismen in beiden Phasen bekräftigt werden konnte (Abb. 12). Für die planktonische Phase wurde eine Anreicherung der γ - und β -Proteobacteria beobachtet, wohingegen die δ -Proteobacteria zunehmend die Elektrode dominierten. Alle drei Klassen enthalten exoelektrogene Vertreter, wobei eine sessil lokalisierte Gruppe auf einen direkten extrazellulären Elektronentransfer (EET) und planktonisch lokalisierten auf einen indirekten EET Mechanismus (Abb. 3 A, C) hindeuten würde. Im letzteren Fall wäre der Prozess auf rezirkulierende Mediatoren angewiesen – die mehrfach reduziert/oxidiert werden – und dadurch auch respiratorisch nicht-exoelektrogen erzeugte Elektronen auf die Elektrode übertragen würden (Sturm-Richter *et al.*, 2015).

In Anbetracht des angestrebten Durchflussprozesses würde dies einen entscheidenden Nachteil darstellen, da sowohl die Organismen als auch die Mediatoren über die Zeit aus dem Prozess gewaschen werden würden und dadurch die Prozesseffizienz sinken würde. Bei näherer Betrachtung der 3. Generation (Elektrode) kann der indirekte EET jedoch ausgeschlossen werden, da hier die geringe CE (12 %) mit einer geringen Häufigkeit der δ -Proteobacteria (9,4 %) korreliert, während die γ -Proteobacteria (17,6 %) und β -Proteobacteria (47,3 %) die dominierende Klasse in der planktonischen und sessilen Phase bilden. Ein weiterer Blick auf die generationenbasierte Anreicherung der δ -Proteobacteria kann dabei mit der zunehmenden Leistungssteigerung des Prozesses korreliert werden, was auf einen direkten EET hindeutet. Im Weiteren wurde dadurch auch gezeigt, dass die ab der 5. Generation beobachtete zunehmende Dominanz der β - und γ -Proteobacteria in beiden Phasen nicht mit dem Abbauprozess korreliert und diese keine funktionelle Rolle im exoelektrogenen Butyrat-Abbau einnehmen.

4.1.2 Metagenom-Analyse

Auf Grundlage der 16S-Amplikon-Analyse konnte eine mit fortschreitender Generation steigende Anreicherung potenziell exoelektrogenen Mikroorganismen in der sessilen Phase nachgewiesen werden. Die nähere Untersuchung der taxonomischen Verteilung deutete auf eine Korrelation zwischen der Effizienzsteigerung und der relativen Häufigkeit der δ -Proteobacteria hin, welche mittels eines direkten EET den exoelektrogenen Butyrat-Abbau katalysieren. Da auf Grundlage der 16S-Analyse keine nähere taxonomische Klassifizierung möglich war, wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit eine Metagenom-Analyse des anodischen Biofilms der 7. Generation durchgeführt. Dies sollte zum einen die Grundlage für die anschließende Metatranskriptom-Analyse schaffen und zusätzlich ein genaueres Bild der phylogenetischen Zusammensetzung der Gemeinschaft ermöglichen.

Zunächst bekräftigte das Ergebnis der Metagenom-Analyse die Erkenntnisse der vorangegangenen 16S-Amplikon-Analyse (Abb. 13 A). Die δ -Proteobacteria bildeten erneut die dominanteste Gruppe, wobei im weiteren Vergleich der Analysen auch deutliche Divergenzen in den ermittelten Häufigkeiten festgestellt wurden. Hierbei erscheint auffällig, dass im Vergleich zur 16S-Amplikon-Analyse alle Klassen einen deutlich geringeren Gesamtanteil in der Gemeinschaft einnehmen (Tab. 22).

Tab. 22: Vergleich der Metagenom- und 16S-Amplikon-Analyse auf Klassenebene.

Klasse	relative Häufigkeit [%]	
	Metagenom-Analyse	16S-Amplikon-Analyse
δ -Proteobacteria	90,12	73,53
β -Proteobacteria	4,12	5,95
Negativicutes	2,31	11,05
Clostridia	1,41	4,12
γ -Proteobacteria	1,02	6,02
< 1 %	0,02	0

Eine mögliche Erklärung könnte auf den methodischen Ansatz der 16S-Amplikon-Sequenzierung zurückzuführen sein. Hierbei wird das Probenmaterial einer Amplifikation unterzogen, wobei organismenspezifische Unterschiede in der Amplifikationseffizienz auftreten können und die real vorliegende Häufigkeit der Gemeinschaft verfälscht (Hansen *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 2019). Im vorliegenden Fall ändert dies jedoch nichts an der Verifizierung der Hypothese, dass die δ -Proteobacteria die dominanteste Klasse auf der Elektrode bilden und sehr wahrscheinlich auch die funktionalen Hauptakteure des anodischen Prozesses darstellen. Die weitere Aufschlüsselung der Daten auf Gattungsebene zeigte auf, dass insgesamt 61 Gattungen identifiziert wurden, wobei nur die Gattungen *Geobacter* (73,5 %) und *Sporomusa* (2,3 %) mit einer Häufigkeit von über 1 % vorkamen (Abb. 13 B).

Die *Sporomusa*-Gattung repräsentiert mit einer relativen Häufigkeit von 2,3 % vollständig die Klasse der *Negativicutes* (2,3 %). Die Gattung wurde ursprünglich 1984 durch Möller und Kollegen geschaffen, um eine Reihe anaerober, homoacetogener Organismen einzuordnen, welche die Eigenschaft einer Gram-negativen Zellwand und die Bildung von Endosporen teilen. Alle Gattungsvertreter sind zum autotrophen Wachstum befähigt, wobei H_2 als Elektronendonator im reduktiven Acetyl-CoA Weg genutzt wird (Kane & Breznak, 1991; Ljungdahl, 1969). Auch die mixotrophe H_2 -Nutzung mit C_1 -Verbindungen wie Methanol und Formiat ist beschrieben, was auf eine Mitgliedschaft in fermentativen Gemeinschaften hindeutet (Breznak, 2006). Aus physiologischer Sicht gehören Vertreter der *Sporomusa*-Gattung zu den produktivsten acetogenen Biokatalysatoren, die einen verstärkten Einsatz in der biotechnologischen Gasfermentation ($H_2:CO_2$) zur Acetatsynthese finden (Aryal *et al.*, 2017). Aufgrund ihrer hohen H_2 -Affinität sind auch Anwendungen in mikrobiellen Elektrosyntheszellen beschrieben (Nevin *et al.*, 2010). Der Mechanismus der kathodische Elektronenaufnahme ist umstritten, wobei aktuell von einer indirekten Aufnahme über molekular gebildeten H_2 ausgegangen wird (May *et al.*, 2016; Tremblay & Zhang, 2015).

In Bezug auf die Anreicherung aus einer Umweltprobe finden sich Studien, die in einem MES-Konsortium eine große Population an *Sporomusa* spp. anreicherten (Zhu *et al.*, 2015). In Bezug auf die in dieser Arbeit durchgeführten anodischen Anreicherung erscheint die Anwesenheit von *Sporomusa* auf Grundlage von bisherigen Studien unschlüssig, wobei auch keine Hinweise über einen Butyrat-Abbau auffindbar sind.

Im Gegenteil bildet *Geobacter* als Vertreter der δ -Proteobacteria die charakteristischste Gattung exoelektrogener Mikroorganismen, die nachweislich häufig als dominierende Gattung anodischer Anreicherungen auftreten (Bond & Lovley, 2003; Lovley *et al.*, 2011). Alle Stammarten können die Reduktion von Fe[III] mit der Oxidation von Acetat koppeln, was auf hoch konservierte Gene des Acetat-Abbaus und des extrazellulären Elektronentransfer (*c*-Typ Cytochrome) zurückzuführen ist (Butler *et al.*, 2010). Die Oxidation anderer Elektronendonoren variiert stark, wobei Spezies bekannt sind, die neben Acetat, Propionat und Butyrat auch Aromaten oder H₂ nutzen können (Röling, 2014). Neben ihrem Einsatz in der Bioremediation, zur Schwermetallfällung in Böden, ist deren prominenteste Anwendung – wie bereits genannt - die Erzeugung elektrischer Energie in bioelektrochemischen Systemen (Anderson *et al.*, 2003; Lovley *et al.*, 2011). Den entscheidenden Vorteil bildet deren effizienter direkter Elektronentransfer auf unlösliche Elektroden, der in Kombination mit der Ausbildung mechanisch stabiler Biofilme die Quervernetzung zu räumlich entfernten exoelektrogenen und nicht-exoelektrogenen Organismen erlaubt und dadurch den Elektronentransfer verbessert (Guang *et al.*, 2020; Röling, 2014). Eine tiefere taxonomische Identifizierung auf Speziesebene war auf Grundlage des Metagenom-Datensatzes nicht möglich.

Um dennoch erste Hinweise über die vorliegende Spezies zu erhalten, wurden die identifizierten 16S-rDNA Abschnitte der *Geobacter*-Gattung aus den Daten isoliert und mittels des Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, NCBI) einer externen Suche unterzogen. Hierbei wurde mit einer *identity* von 99,7 % die Spezies *Geobacter bemidjiensis* identifiziert (Tab. 23). Im Abgleich mit der Literatur ist diese befähigt die Reduktion von Fe[III] oder Mn[IV] mit der Oxidation von organischen Säuren (Acetat, Propionat, Butyrat) und einer Vielzahl anderer Kohlenstoffverbindungen wie Aromaten oder Alkoholen zu koppeln (Nevin *et al.*, 2005). Bisher konnte kein Nachweis über eine Elektrodenreduktion, respektive Stromerzeugung, in einem bioelektrochemischen System erbracht werden (Aklujkar *et al.*, 2010; Nevin *et al.*, 2005). Dies ist gegensätzlich zu den Beobachtungen dieser Arbeit, wobei davon ausgegangen werden kann, dass in dieser Arbeit eine neuartige Subspezies angereichert wurde, die die Annahme der aufgeführten Studien revidiert. Der molekulare Hintergrund der bisherig ausgeschlossenen Elektrodenreaktion ist ungeklärt.

Die Isolation der in dieser Arbeit vorliegenden Subspezies und deren Genomsequenzierung könnte zur Aufklärung dieses Hintergrunds beitragen, wobei durch einen Genomvergleich mit bereits isolierten *Geobacter bemidjiensis* Subspezies Unterschiede im EET aufgedeckt und ein tieferer Einblick in die molekularen Hintergründe ermöglicht werden könnte. Im Überblick legen die Erkenntnisse der Metagenom-Analyse eine erfolgreiche Anreicherung einer *Geobacter*-Gattung nahe, deren Anwesenheit aufgrund der in der Literatur beschriebenen Eigenschaften, ein hohes Potential der exoelektrogenen Butyrat-Elimination im Prozess indiziert.

4.1.3 Metatranskriptom-Analyse

Da auf Grundlage der Metagenom-Daten kein physiologisch tieferes Verständnis gegeben werden konnte, wurde basierend auf der 7. Elektrodengeneration eine Metatranskriptom-Analyse durchgeführt. Zur Aufdeckung der am exoelektrogenen Butyrat-Abbau maßgeblich beteiligten Hauptakteure, dienten neben funktionalen Biomarkern der Butyrat-Oxidation und des Acetatmetabolismus auch *c*-Typ Cytochrome als Untersuchungsgrundlage (Tab. 18).

Anhand der ermittelten Expressionswerte der Butyrat-Kinase (*buk* - 332 TPM), Phosphat-Butyryltransferase (*ptb* - 153 TPM) und Citratsynthase (*cs* - 382 TPM), konnte wie vermutet die *Geobacter*-Gattung als Hauptakteur des Butyrat-Abbaus identifiziert werden. Im Weiteren ist durch die Expressionswerte potenzieller *c*-Typ Cytochrome (5553 TPM) auch gezeigt, dass diese Gattung den funktionalen Hauptakteur des anodischen Prozesses bildet. Da die Analyse keine Hinweise auf eine Phenazin- oder Riboflavinsynthese gab, kann die Gattung als einzige Verbindung zur Elektrode angesehen werden. Im weiteren Blick auf *Sporomusa* wurde eine im Vergleich schwache Expression der *buk* (3 TPM) ermittelt, wobei eine unvollständige Rekonstruktion des Abbauweges diese als butyrat-oxidierenden Gruppe ausschließt. Einen weitaus interessanteren Aspekt bildete der Nachweis des hoch oxidationsempfindlichen Kohlenmonoxid-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthase-Komplexes (*acsA/B* - 16 TPM), welcher den Schlüsselschritt (Kondensation der gebildeten Methyl- und Carbonyl-Gruppe unter CoA Einbezug in Acetyl-CoA) im reduktiven Acetyl-CoA Weg (Wood-Ljungdahl Weg) katalysiert (Ljungdahl, 1969). Ausgehend von einer autotrophen Acetat-Assimilation, wurde auch der nachfolgende Energiekonservierungsschritt anhand der Expression der Phosphat-Acetyltransferase (*pta* - 7 TPM) und Acetat-Kinase (*ack* - 7 TPM) nachgewiesen. Die Suche nach potenziell an der Wasserstoffaufnahme beteiligten Hydrogenasen und Formiat-Dehydrogenasen zeigte einen HdrABC-homologen Komplex

(46 TPM), eine HndBCD-homologe 4Fe-4S Hydrogenase (15 TPM) und eine Formiat-Dehydrogenase (*fdhA/B* - 5 TPM). Die erstere Hydrogenase ist maßgeblich an der Reduktion von CO₂ im Methyl-Zweig beteiligt und ist sowohl für methanogene als auch acetogene Organismen beschrieben (Mock *et al.*, 2014). Die genaue Funktion ist bisher ungeklärt, es wird jedoch spekuliert, dass dieser mit einer Reihe von wasserstoffoxidierenden Ni-Fe Hydrogenase in Verbindung steht und mittels des erst kürzlich entdeckten Falvin-basierten Elektronen-Bifurkations-Prozesses an der Reduktion von Ferredoxin beteiligt ist, das im Weiteren der CO₂-zu-Formiat-Reduktion dient (Buckel & Thauer, 2018; Kremp *et al.*, 2020; Wagner *et al.*, 2017). Befunde über potenziell beteiligte Ni-Fe Hydrogenasen blieben aus. In Bezug auf die identifizierte HndBCD-homologe 4Fe-4S Hydrogenase legen Studien von Poehlein und Kollegen (2012) nahe, dass diese im Carbonyl-Zweig an der Oxidation von molekulare H₂ beteiligt ist. Die Elektronen können hierbei entweder an den Kohlenmonoxid-Dehydrogenase/ Acetyl-CoA-Synthase-Komplex übergeben werden (zur Reduktion von CO₂ zu CO) oder für die Formiat-Assimilation genutzt werden (Poehlein *et al.*, 2012). Im Überblick konnte die autotrophe Acetat-Assimilation über den Wood-Ljungdahl Weg für *Sporomusa* vollständig rekonstruiert werden, wobei dieser den einzigen CO₂-Fixierungsweg darstellte.

Ausgehend von einer autotrophen Acetat-Assimilation und dem Ausbleiben einer Acetat-Akkumulation im zeitlichen Verlauf der 7. Generation (Abb. 10 E), stellte sich im Weiteren die Frage nach dem Acetatkonsumenten in der Gemeinschaft. Dazu gab das ermittelte Expressionsmuster der *ack* und *pta* erste Hinweise, wobei für beide Genprodukte eine hohe Expression für die *Geobacter*-Gattung ermittelt wurde (*ack* - 1265 TPM und *pta* - 502 TPM). Darauf hindeutend, dass diese Gattung auch an der anodischen Acetat-Oxidation beteiligt ist, wurde die Untersuchung auf gattungsspezifische hoch konservierte acetat-abbauende Schlüsselschritte erweitert. Als Untersuchungsmerkmal diente die Succinyl:Acetat-CoA Transferase (*ato-1*), welche die reversible CoA-Übertragung zwischen Succinyl-CoA und Acetat katalysiert und die Acetyl-CoA Synthetase (*acs*), welche die irreversible Synthese von Acetyl-CoA unter Verwendung zweier ATP katalysiert (Aklujkar *et al.*, 2009). Beide Enzyme wurden mit einer hohen Expression (*ato-1* - 310 TPM und *acs* - 1115 TPM) für *Geobacter* nachgewiesen, was final eine acetatbasierte Wechselwirkung zwischen *Sporomusa* und *Geobacter* aufzeigt. Für die Annahme einer autotrophen Acetat-Assimilation aus H₂ und CO₂ durch *Sporomusa*, fehlt nach der Aufklärung der Acetat-Dissimilation durch *Geobacter*, nur noch die Klärung der Wasserstoffquelle, die für die Operation des Wood-Ljungdahl Weges von Nöten ist.

In Bezug auf die durchgeführte Suche nach potenziell wasserstoffproduzierenden Hydrogenasen, wurde für die *Geobacter*-Gattung die HyA- (48 TPM) und MvhDJ-Hydrogenase (6 TPM) identifiziert. Beiden Hydrogenasen wird eine wasserstoffproduzierende Rolle zugesprochen, wobei eine aktuelle Studie deren Expression mit einem Überschussmetabolismus in Verbindung bringt (Coppi, 2005; Mollaei *et al.*, 2021). Im Speziellen wird für die HyA-Hydrogenase postuliert, dass diese mit dem Menanquinopool der Zelle in Verbindung steht und überschüssige Elektronen zur Protonenreduktion nutzt (Tamagnini *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu wird der MvhDJ-Hydrogenase eine intrazelluläre Elektronentransportroute zugesprochen, wobei diese (eventuell) mit einer Formiat-Dehydrogenase interagiert (Coppi, 2005). Hierbei kann die Formiat-Dehydrogenase entweder als Elektronenakzeptor oder -donor fungieren und entsprechend die Formiat-Assimilation oder -Dissimilation katalysieren. Im ersteren Fall könnte dies mit einem Überschussmetabolismus in Zusammenhang gebracht werden, wobei überschüssige Elektronen mittels einer Formiat-Assimilation abgebaut werden (Coppi, 2005).

Im vorliegenden Fall wurde eine Formiat-Dehydrogenase für *Geobacter* nachgewiesen (195 TPM) und könnte mit den Erkenntnissen der HyA-Hydrogenase weitere Hinweise auf einen Überschussmetabolismus geben. Der allgemein als Überschussmetabolismus bezeichnete Zustand, stellt ein in Eu- und Prokaryoten beobachtetes physiologisches Phänomen dar, in dem trotz ausreichender Elektronenakzeptor-Kapazität eine unvollständige Substratoxidation erfolgt und Acetyl-CoA unter Bildung eines ATP-Moleküls zu Acetat umgesetzt wird (Szenk *et al.*, 2017). Die dabei nicht genutzte oxidative Phosphorylierung, welche über jeden fermentativen thermodynamischen Zustand eine effizientere Ausbeute bilden würde, bildet das physiologische Paradoxon. Dieses Phänomen wird zumeist bei schnellwachsenden Kulturen beobachtet, wobei darüber spekuliert wird, ob durch das Überangebot an Substrat ein schnellerer Abbau (ATP Synthese) über dem Ertrag der maximalen Energieausbeute steht (Helling *et al.*, 1987). Als Ursache wird ein intrazelluläres Redoxungleichgewicht postuliert, dass die Acetatbildung und Wasserstoffproduktion auslöst (siehe Abschnitt 4.1.3).

Inwieweit die *Geobacter*-Gattung Acetat aufgrund eines Überschussmetabolismus produziert, kann auf Grundlage der Daten nicht festgestellt werden. Es wäre jedoch denkbar, dass die zuvor ermittelten Expressionswerte der Acetat-Kinase und Phosphat-Acetyltransferase, ausgehend von Acetyl-CoA, auch die Bildung von Acetat ermöglichen, da die Reaktionen reversibel gestaltet sind (Aklujkar *et al.*, 2009).

Im Überblick ermöglichte die durchgeführte Metatranskriptom-Analyse einen mechanistischen Einblick in die physiologischen Zusammenhänge des funktionalen Teils der anodischen Butyrat-Oxidation. In Kombination mit den Erkenntnissen der durchgeführten 16S-rDNA-Analyse, kann die nicht näher charakterisierte *Geobacter*-Gattung als funktionaler Hauptakteur des anodisch getriebenen Butyrat-Abbaus angesehen werden. Die Daten deuten darüber hinaus auch auf eine syntrophe Wechselwirkung zwischen der *Geobacter*- und *Sporomusa*-Gattung, wobei ein postulierter Überschussmetabolismus die Koexistenz von *Sporomusa* ermöglichen könnte. Auf Grundlage der Daten kann nicht abschließend geklärt werden, um welche Art der Wechselwirkung es sich handelt. Denkbar wären sowohl ein Interspezieselektronentransfer auf Grundlage von H₂, Formiat als auch ein DIET zwischen beiden Gattungen (Abb. 3 D).

Die Rolle der anderen Organismen (*Clostridium*, *Pseudomonas*, *Comamonadaceae*) konnte auf Grundlage der gewählten Biomarker nicht aufgedeckt werden, wobei vor allem deren fakultativ anaerobe Physiologie einen interessanten Aspekt der Anreicherung darstellt (Alvarez-Ortega & Harwood, 2007; Andreesen *et al.*, 1989; Willems, 2014). Um dennoch deren Rolle aufzuklären, könnten die ermittelten Expressionswerte der Gruppen isoliert und nach ihrer Expressionsstärke aufgelistet werden. Eventuell könnte so ein tieferer Einblick in deren metabolische Rolle im System gewährleistet werden. Zusammenfassend lässt sich das in Abb. 25 dargestellte Modell des anodischen Butyrat-Abbaus aufstellen.

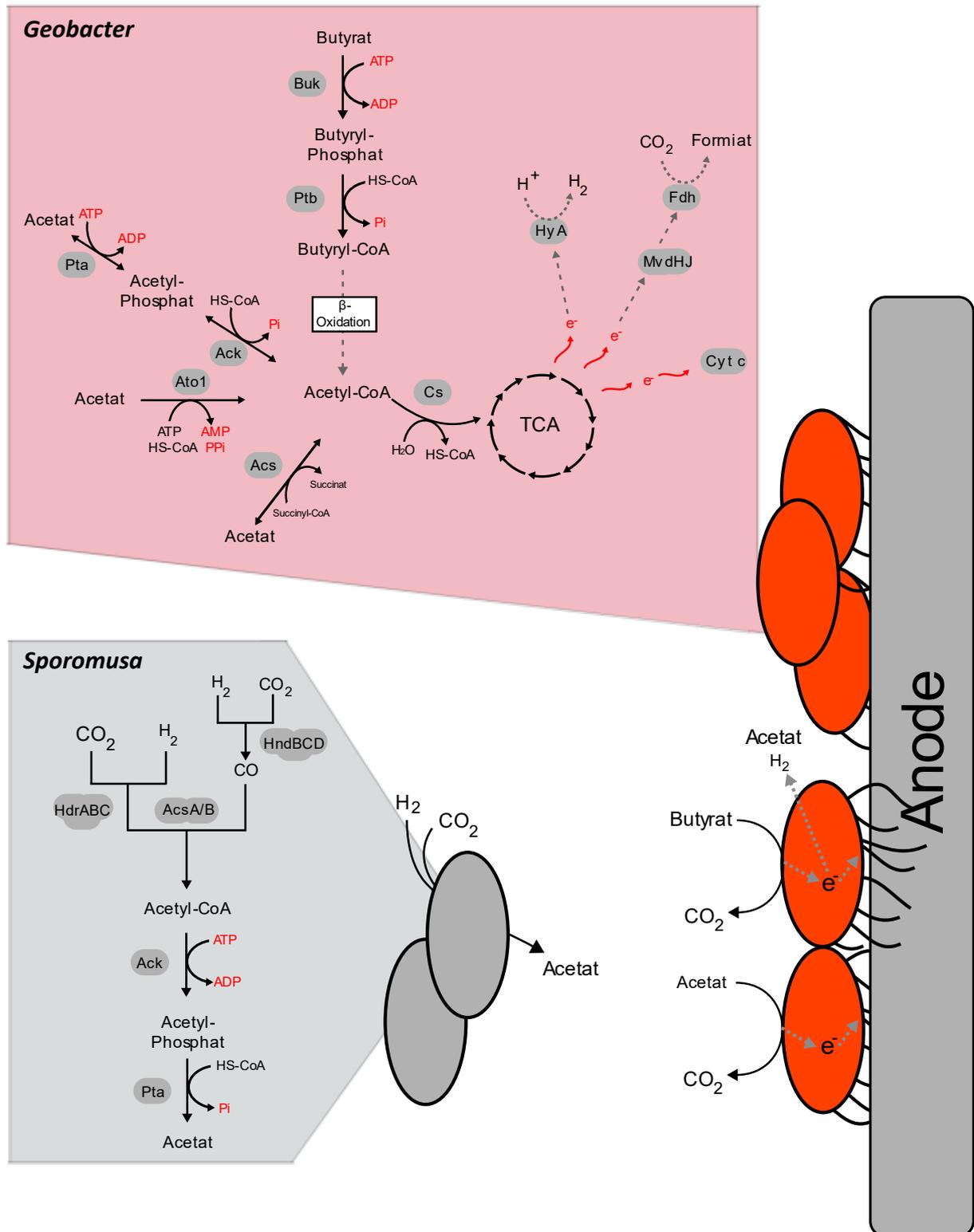


Abb. 25: Modell des exoelektrogenen Butyrat-Abbaus in der angereicherten Gemeinschaft. Die Gennamen sowie die phylogenetische Zuordnung sind reaktionszugehörig dargestellt. **Buk** – Butyrat-Kinase; **Pta** – Phosphat Transacetylase; **Ptb** – Phosphat-Butyryltransferase; **Ack** – Acetat-Kinase; **Ato1** – Acetat:Succinyl-CoA Transferase; **Acs** – Acetyl-CoA Synthetase; **Cs** – Citratsynthase; **HyA** – H₂-produzierende Hydrogenase; **MvdHJ** – H₂-produzierende Hydrogenase; **Fdh** – Formiat-Dehydrogenase; **Cyt c** – Cytochrom C; **HndBCD** – H₂-konsumierende Hydrogenase; **HdrABC** – H₂-konsumierende Hydrogenase; **AcsA/B** – Kohlenmonoxid-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthase-Komplex.

4.1.4 Mikrobielle Interaktion der funktionalen exoelektrogenen Hauptakteure

Die ermittelten Metatranskriptom-Daten der 7. Generation legten einen Überschussmetabolismus der *Geobacter*-Gattung nahe, welcher im Weiteren die Ko-Existenz der *Sporomusa*-Gattung erklären könnte. Aktuellen Studien zufolge könnte sowohl die intrazelluläre Acetyl-CoA Akkumulation, die eine Repression des TCA-Zyklus zur Folge hat – oder eine Limitierung des Elektronentransfers, die Ursachen des Phänomens darstellen (Majewski & Domach, 1990; Zhuang *et al.*, 2011). Ungeachtet der tatsächlichen Ursache erfolgt ein intrazelluläres Redoxungleichgewicht, was die Bildung von Acetat und Wasserstoff zur Folge haben könnte (Vemuri *et al.*, 2006). Im vorliegenden Fall könnte daher von einem gehemmten extrazellulären Elektronentransfer ausgegangen werden, der sich im weiteren Verlauf auf einen gedrosselten Butyrat-Abbau niederschlägt und eine verminderte CE nach sich ziehen könnte (Elektronenverlust durch H₂-Ausgasung). Zur näheren Aufklärung wurden Ansätze mit und ohne die Zugabe des δ -Proteobakteriums *G. sulfurreducens* untersucht (Abschnitt 4.1.4). Der Idee lag zugrunde, dass durch die Zugabe des Organismus entweder i) die erzeugten Produkte des Butyrat-Abbaus (Acetat und H₂) effizienter genutzt werden oder ii) eine Verbesserung der respiratorischen Elektronenübertragung erzielt wird. Wie aus einigen Studien bekannt, kann die Zugabe von *G. sulfurreducens* die Elektronentransferrate sowohl von exoelektrogenen als auch nicht-exoelektrogenen Populationen maßgeblich verbessern (Röling, 2014; Schmidt *et al.*, 2018; Brunner *et al.*, 2019). Als Evaluationsparameter diente sowohl die ermittelte CE, die mittlere Stromdichte als auch die Butyrat-Abbau-Kinetik.

Der direkte Vergleich der ermittelten Kinetik des Butyrat-Abbaus zeigte auf, dass der Butyrat-Abbau unter der Zugabe von *G. sulfurreducens* nicht maßgeblich verbessert wurde. Im Weiteren wurde jedoch eine ca. 25 % höhere Stromdichte und CE im Vergleich zum Ansatz ohne *G. sulfurreducens* festgestellt. Im Zusammenhang deutet dies nicht auf die Verbesserung der respiratorischen Kapazität hin, jedoch auf die effizientere Nutzung der Intermediate des Butyrat-Abbaus. Bei näherer Betrachtung der durch die Butyrat-Oxidation freiwerdenden Elektronen ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um H₂ handelt. Theoretisch liefert die vollständige Oxidation von Butyrat zu CO₂ 20 Elektronen. Für den Ansatz ohne *G. sulfurreducens* wurde eine CE von ca. 80 % ermittelt, wobei davon ausgegangen werden könnte, dass im Falle eines Überschussmetabolismus pro Molekül Butyrat 2 Moleküle Acetat und H₂ entstehen. Für den Fall, dass ein Großteil des entstandenen H₂ aus dem System diffundiert und pro oxidierten Molekül Acetat 8 Elektronen frei werden, würde dies einer theoretischen CE von 80 % entsprechen (16/20 Elektronen).

Für den Ansatz mit *G. sulfurreducens* kann davon ausgegangen werden, dass H₂ als zusätzliche Elektronenquelle dient und sich dies auch in der CE von 100 % widerspiegelt (20/20 Elektronen). Darüber hinaus könnte spekuliert werden, ob *G. sulfurreducens* eine höhere Affinität zu H₂ besitzt als die nicht näher identifizierte *Sporomusa*-Gattung. Ein weiterer interessanter Punkt könnte sein, ob die Zugabe von *G. sulfurreducens* die *Sporomusa*-Gattung über den Prozess verdrängt, wobei zur Einordnung eine Diversitätsanalyse beider Ansätze von Nöten wäre. Auf Grundlage der erhöhten CE und mittleren Stromdichte kann von einer metabolischen Kooperation zwischen der Gemeinschaft und *G. sulfurreducens* ausgegangen werden, die im Weiteren auf eine herausragende physiologische Eignung für die anodengestützte Oxidation von Acetat und Butyrat im anvisierten Prozess deutet.

4.2 Einflussfaktor Substrat

Das primäre Merkmal eines anodischen Prozesses bildet dessen Effizienz, die durch die Elektronenübertragungsrate der exoelektrogenen Mikroorganismen definiert ist. Hierbei korreliert die Übertragungsrate mit dem physiologischen Zellzustand, der durch eine Reihe physikalischer Parameter (pH-Wert, Temperatur, usw.) und auch im Elektrolyten befindlicher Substanzen beeinflusst wird (Guang *et al.*, 2020; Kokko *et al.*, 2018). Im Vergleich zu Laboruntersuchungen nutzen anwendungsorientierte Prozesse zumeist Abfallströme, die eine deutlich komplexere und undefiniertere Substratzusammensetzung besitzen. In Abhängigkeit der Substratherkunft, können diese neben physiologisch verträglichen Verbindungen auch eine Reihe limitierender Substanzen aufweisen. Den Schlüssel des anwendungsorientierten Betriebes stellt die umfängliche Substratcharakterisierung dar, um potenzielle Störfaktoren vor der Anwendung zu identifizieren (Lu *et al.*, 2014). Aus diesen Gründen wurde in einem initialen Experiment der physiologische Einfluss der in dieser Arbeit verwendeten Hydrolyseflüssigkeit auf den Laborstamm *G. sulfurreducens* in unterschiedlichen Konzentrationen näher untersucht. Hierbei wurde ein stark gehemmtes Wachstum für Konzentrationen bis 25 % (v/v) festgestellt, wobei für höhere Konzentrationen das Wachstum vollständig ausblieb (Abb. 15). Diese Beobachtung veranlasste in einer weiteren Untersuchungsreihe eine umfängliche analytische Charakterisierung der ionischen, organischen und anorganischen Zusammensetzung der Hydrolyseflüssigkeit, um potenzielle Störfaktoren zu identifizieren. Um deren Störpotential einzuordnen, wurden die ermittelten Konzentrationen zum einen mit Literaturwerten abgeglichen und zum anderen durch synthetische Testreihen überprüft. In Bezug auf eine Schwermetallionenbelastung konnten die ermittelten Konzentrationen auf der Grundlage einer Studie von Burkhardt und Kollegen (2011) als nicht störend eingeordnet werden, was auch für die ermittelten Phosphat- und Sulfatkonzentrationen galt (Tab. 20).

Im Gegensatz erschien die Natriumkonzentration von > 400 mM überdurchschnittlich hoch (im Vgl. Meerwasser 300 mM, Junge & Werby, 1958). Der negative Einfluss auf die mikrobielle Physiologie ist bekannt, wobei mit einer durchgeführten Testreihe eine steigende Hemmung des bakteriellen Wachstums ab 100 mM aufgedeckt wurde (Abb. 18 A). Im weiteren Literaturvergleich zeigten Miyahara und Kollegen (2015), dass Natriumkonzentrationen über 100 mM einen toxischen Einfluss auf eine anodische *Geobacter*-Gemeinschaft nehmen. Der Wirkmechanismus einwertiger Ionen beruht auf der Wechselwirkung mit der zellulären Phospholipidmembran, wobei eine ansteigende Konzentration von Natriumionen die Zellmembran destabilisiert und eine osmotische Schädigung herbeiführt (Gurtovenko & Vattulainen, 2008). Die Ursache der hohen Natriumkonzentration ist sehr wahrscheinlich auf die vorgeschaltete Dunkelfermentation zurückzuführen, da während des Prozesses auf eine automatisierte pH-Justierung mit NaOH zurückgegriffen wurde (Ali *et al.*, 2020).

Im weiteren Zuge der Untersuchung wurden auch hohe Konzentrationen an den organischen Säuren Acetat (124 mM), Propionat (60 mM) und Butyrat (65 mM) ermittelt, die bis zu 71 % des löslichen Gesamtkohlenstoffanteils einnahmen (Tab. 19). Unter der Annahme, dass diese einen negativen Effekt auf die mikrobielle Physiologie ausüben, wurde deren Einfluss auf den Laborstamm *G. sulfurreducens* unter synthetischen Bedingungen (Mischung 10, 25 und 50 mM) untersucht (Abb. 16). Hierbei konnte ein toxischer Einfluss für Konzentration über 10 mM aufgedeckt werden, was schlüssig zu vorangegangener Beobachtung in *E. coli* ist (Roe *et al.*, 1998). Interessanterweise gestaltet sich der Wirkmechanismus der jeweiligen Säuren unterschiedlich. Während Acetat die Biosynthese von Methionin stört und Butyrat einen multifaktoriellen osmotischen Effekt herbeiführt (Guan & Liu, 2020; Roe *et al.*, 2002), führt Propionat zur mechanistischen Entkopplung der Cytoplasmamembran, was nachfolgend, Vorgänge in der Atmungskette stört (Salmond *et al.*, 1984). In einer weiteren synthetischen Testreihe sollte somit geklärt werden, ob ein synergistischer Wirkmechanismus aller Säuren in der Hydrolyseflüssigkeit vorliegt oder der Organismus eine Toleranz gegenüber einzelnen Säuren aufweist. Die Ergebnisse zeigen für eine steigende Konzentration an Propionat und Butyrat (> 10 mM) eine zunehmende Hemmung des Wachstums, wohingegen für die getesteten Acetatbedingungen weder eine Hemmung noch Einschränkung im Vergleich zur Positivkontrolle beobachtet wurde (Abb. 17). Die letztere Beobachtung lässt sich mit der Physiologie des Laborstamms erklären, da Acetat das primäre heterotrophe Substrat des Stammes ist und von einer speziesspezifischen Resistenz ausgegangen werden kann, die durch eine schnellere Abbaurate erklärbar ist.

Zusammenfassend wurden Konzentrationen über 10 mM Propionat, Butyrat und über 100 mM Natrium als hemmende Faktoren eingestuft, wobei von einem synergistisch toxischen Effekt aller drei Komponenten auszugehen ist. Diese Befunde stellten eine Einschränkung des angestrebten anodischen Prozesses dar, die die bioelektrochemische Behandlung der Hydrolyseflüssigkeit nicht ermöglichen würden. Eine weitere Einschränkung stellte der in Vorexperimenten beobachtete Abfall des pH-Wertes im bioelektrochemischen System dar (Abb. 30), der wahrscheinlich eine Kombination aus geringer Pufferkapazität der Hydrolyseflüssigkeit und Ansäuerung durch die konstante N₂/CO₂-Begasung ist. Der Abfall des pH-Wertes ging mit einem Stromdichteneinbruch einher, wobei die Korrelation zwischen saurem pH-Wert und Prozesseinbruch schon in früheren Arbeiten beobachtet werden konnte (Patil *et al.*, 2011; René A. Rozendal *et al.*, 2008).

Um den pH-Wert im physiologischen Bereich zu halten, wurde das System mit einem automatisierten pH-Titrationsmodul ausgestattet. Da hohe Konzentrationen an Natrium bereits vorlagen und eine weitere Steigerung einen zunehmend toxischen Effekt herbeiführen würde, wurde der Einfluss von Kalium als Alternative untersucht. Der Wahl von Kalium lag zugrunde, dass der Einfluss eines kleineren einwertigen Ions (im Vergleich zu Natrium) eine geringere Wechselwirkung mit der Phospholipidmembran eingeht und dadurch einen geringeren Einfluss auf die Physiologie des Organismus nimmt (Arnott *et al.*, 2018; Kostitskii *et al.*, 2017). Ein durchgeführtes Wachstumsexperiment mit analogen Konzentrationen zu den zuvor getesteten Natriumkonzentrationen, bestätigt diese Annahme (Abb. 18 B). Die Erweiterung des Systems mit einem pH-Modul behob die pH-Problematik, jedoch nicht die in der Hydrolyseflüssigkeit befindlichen hohen Säurekonzentrationen, welche darüber hinaus auch das Prozesssubstrat darstellen. Eine Möglichkeit hätte die Verdünnung der Hydrolyseflüssigkeit auf physiologische Konzentrationen darstellen können, hätte jedoch die anwendungsorientierte Umsetzung gefährdet. Die einzig weitere Möglichkeit bildete die Adaptation der Mikroorganismen an hohe Säurekonzentrationen, was eine erhöhte Resistenz und somit eine ausbleibende Hemmung durch die im Substrat vorkommenden Konzentrationen zur Folge hätte. Im Allgemeinen sind Mikroorganismen zur Resistenzausbildung gegenüber Umweltschadstoffen befähigt. Diese Fähigkeit unterliegt der Evolution als Reaktion auf Störstoffe, wobei genomische und/oder transkriptionelle Veränderungen zur Entwicklung neuartiger Enzyme oder kataboler Wege führen können (Kolvenbach *et al.*, 2014; Meer, 2006). Der resultierende Phänotyp kann ein morphologisches oder physiologisches Merkmal aufweisen, was diesem einen Vorteil gegenüber dem anliegenden Reiz verschafft.

Bekannte Beispiele aus der Natur sind die Ausbildung von Resistenzmechanismen gegenüber Antibiotika oder Schwermetallen, wobei auch die Adaptation im Labor durch stetiges Annähern an den Grenzwert möglich ist (Di Cesare *et al.*, 2016; Pfaender *et al.*, 1985). Die gerichtete Vorhersage solcher Ereignisse gestaltet sich schwierig, da sowohl Faktoren wie die Mutationsfrequenz und der Wahrscheinlichkeit des Auftretens in einem bestimmten genetischen Bereich zumeist unbekannte Variablen darstellen (Patel & Rosenthal, 2007). Da die genannten Faktoren jedoch als Funktion der Zeit abgeleitet werden können, kann die langfristige Exposition des Reizes als entscheidender Schritt der Anpassung gesehen werden (Koskella & Vos, 2015). Dem liegt zugrunde, dass zunächst mehrere Phänotypen in der Population auftreten, wobei eine anhaltende Reizdisposition die Selektion des am besten angepassten Phänotyps ermöglicht (Patel & Rosenthal, 2007). Ein weiterer wichtiger Faktor stellt die Art und Stärke des Reizes dar. Kowalczyk und Kollegen (2015) zeigten, dass die Anpassung an physikalische Bedingungen wie ein nicht physiologischer pH-Wert im Vergleich zu einer steigenden Antibiotikakonzentration deutlich kritischer ist. Dies ist auf die Art der Reizbekämpfung zurückzuführen, wobei ein abbaubarer Reiz physiologisch einfacher zu bekämpfen ist als im Vergleich zu physikalischen Reizen.

Da die in der Hydrolyseflüssigkeit befindlichen Störstoffe durch eine höhere Abbaurate bekämpft werden können, bietet sich das Verfahren der Adaptation an, da dadurch nicht nur eine Resistenz *per se* aufgebaut wird, sondern auch durch den erhöhten Abbau zusätzlich die Effizienz des Prozesses an sich gesteigert werden kann. In Bezug auf die Anpassung im bioelektrochemischen System findet sich in der Literatur eine Studie von Brunner und Kollegen (2019). Vor dem Hintergrund einer toxischen Phosphat- und Ammonium-Konzentration, gelang es den Autoren durch die Kombination aus Voradaptation im bioelektrochemischen System und graduellem Austausch von Industrierwasser-zu-Medium, eine Anpassung der exoelektrogenen Gemeinschaft an die toxischen Bedingungen zu erreichen. Darauf bezogen wurde die in Abschnitt 3.4 dargestellte Anpassungsstrategie nach der Vorgehensweise von Brunner und Kollegen durchgeführt. In der initialen Voradaptation sollte dem Laborstamm zunächst die Ausbildung eines Biofilms erlaubt werden, der wie bekannt die mechanisch stabilste Form von Bakterien darstellt, um sich vor toxischen Umgebungsreizen zu schützen. In der darauffolgenden Austauschphase erfolgte der durchflussbasierte Hydrolysat-zu-Medium-Austausch, um eine gradienten-basierte Anpassungsumgebung mit steigender Konzentration über die Zeit zu schaffen. Zur Reduktion weiterer toxischer Einflüsse, wurde über den gesamte Prozessverlauf der pH stets auf pH 7 gehalten.

Um Rückschlüsse auf die Physiologie des Organismus und dessen Zustand zu erhalten, diente die aufgezeichnete Stromdichte als Indikator. Im direkten Vergleich der Stromdichten zwischen Voradaptions- und Austauschphase wurde nur ein geringer Stromdichteneinbruch mit steigender Säurekonzentration festgestellt (Abb. 19), was auf eine Resistenzausbildung gegenüber der toxischen Hydrolyseflüssigkeit schließen lässt. Im Weiteren kann dies auch durch den Vergleich der mittleren Stromdichten gestützt werden, wobei mit $188 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ in der Voradaptationsphase und $175 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ in der Austauschphase diese nur um 7 % geringer ist. Eine unzureichende Anpassung hätte zum Einbruch der mittleren Stromdichte führen müssen, was jedoch nicht der Fall war. Die erneute Belastung des Laborstammes, mit einer Verfünffachung der Flussgeschwindigkeit, bestätigt dabei, dass es zu einer Anpassung an die toxischen Umgebungsbedingungen kam. Auch hier wurde eine mittlere Stromdichte von $160 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ermittelt, die um 8,6 % von der vorherigen Phase abwich.

Im Überblick konnte durch die vollständige Analyse der Hydrolyseflüssigkeit hohe Konzentrationen an Acetat, Propionat, Butyrat und Natrium als Störstoffe identifiziert werden. Durch die Kombination einer bioelektrochemischen Voradaptation und einer Gradientenbasierten Belastung der Anoden-lokalisierten Organismen konnte eine Adaptationsumgebung geschaffen werden, die zu der physiologischen Überwindung der hoch problematischen Säurekonzentrationen führte und dadurch die biologische anodische Behandlung der Hydrolyseflüssigkeit erlaubte. Da die gewählte Strategie sowohl system- als auch organismenunabhängig ist, könnte diese im Weiteren auch auf das Fließzellensystem mit *G. sulfurreducens* und der Butyrat-Gemeinschaft übertragen werden.

4.3 Anwendungsorientierte Umsetzung im Fließzellensystem

Die größte Limitierung anwendungsorientierter bioelektrochemischer Prozesse stellt bisher deren geringe Effizienz dar. Den limitierenden Faktor bildet die Elektrodenreaktion, da deren Produktivität direkt proportional zur elektrochemischen Oberfläche korreliert (Krieg *et al.*, 2014). Den Schlüssel des produktiven Betriebs stellt die Ausbildung hoch kompakter anodischer Biofilme dar, die durch strukturelle und metabolische Vernetzung die anodische Oberfläche bedecken und die Umsatzrate des Prozesses definieren (Edel *et al.*, 2019). Da mit steigender Ausbildung komplexer Schichten auch die Substratversorgung im Biofilm sinkt, entscheiden hydrodynamische Reaktorkonzepte über dessen Wirkungsgrad. Für die anwendungsorientierte Umsetzung sind daher Fließzellensysteme gefordert, die neben einem optimierten Design auch die Durchflusskonfiguration erlauben, um den Biofilm mit ausreichend Substrat zu versorgen (Krieg *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2017).

Das im Zuge einer interdisziplinären Kooperation entwickelte *Flat-Plate-Cell* System ist ein klassisches zwei-Kammersystem, in dem das anodische und kathodische Kompartiment mittels einer Membran voneinander getrennt sind. Das Reaktionsvolumen pro Kammer beträgt 50 ml und ist je mit einem eigenen Medienreservoir ausgestattet, das den rezirkulierenden Betriebszustand ermöglicht. Die Erweiterung des Systems mit dem zuvor dargestellten pH-Modul, sowie das Anlegen eines Durchflussgradienten mit Hydrolyseflüssigkeit ermöglichte die Übertragung der in Abschnitt 3.4 erarbeitenden Erkenntnisse. Im Vergleich zum Golitsch-System steht auch hier eine 36 cm² Elektrode zur Verfügung, wohingegen das Elektroden-zu-Reaktionsvolumen höher ist (Golitsch-System 0,13 cm²/ml, FPC – 0,72 cm²/ml) und in Kombination mit dem rezirkulierenden Betrieb die optimale Substratversorgung des Biofilms gewährleistet. Als Inokulum diente die angereicherte butyrat-oxidierende Gemeinschaft unter Zugabe von *G. sulfurreducens*, um selektiv Acetat und Butyrat aus der Hydrolyseflüssigkeit zu eliminieren. Die Prozessphasen des Experiments umfassten die initiale Anhaftungsphase unter synthetischen Bedingungen (Tag -14 bis 0) – zur Ausbildung eines Biofilms – gefolgt von einem graduellen Austausch des Mediums mit Hydrolysat (Tag 0 bis 17), um analog zu Abschnitt 3.4 die Anpassung der exoelektrogenen Gemeinschaft an die toxischen Einflüsse der Hydrolyseflüssigkeit zu ermöglichen. In der abschließenden Phase wurde der rezirkulierende Betrieb gewählt (Tag 17 bis 59), um die Praktikabilität des Prozesses zu ermitteln. Zur Überwachung des Prozesses diente der Stromdichtenverlauf und die detektierten Säurekonzentrationen. In der abschließenden rezirkulierenden Prozessphase wurde zusätzlich der lösliche Kohlenstoffanteil ermittelt und daraus das DOC_{VFA}/DOC-Verhältnis gebildet, um Aufschluss über die Prozessspezifität zu erhalten.

In Bezug auf die organischen Säuren wurde sowohl in der initialen Phase (Tag -14 bis 0) sowie in Teilabschnitten der rezirkulierenden Phase (Tag 17 bis 38) der Abbau aller drei Säuren beobachtet, der jeweils nur mit einer geringen CE einherging (initialen Phase – 36 %, rezirkulierende Phase Tag 17 bis 26 – 10 %). Unter thermodynamischen Gesichtspunkten wäre von einem bevorzugten exoelektrogenen Abbau von Acetat – gefolgt von Butyrat – ausgegangen, während der Abbau von Propionat erst bei sehr niedrigen Acetat- und Butyrat-Konzentrationen eintreten würde (Van Lier *et al.*, 1993; Schmidt *et al.*, 2018). Eine Erklärung dieses Phänomens könnte eine Sauerstoffkontamination sein, wobei davon ausgegangen werden könnte, dass solange die Kontamination gering genug ausfällt, der fakultativ aerobe Anteil der Organismen den Sauerstoff eliminiert und dadurch die strikt anaerobe exoelektrogenen Organismen auf der Elektrode schützt (Cusick *et al.*, 2010; Jung & Regan, 2007).

Die damit einhergehende höhere Energiegewinnung des aeroben Atmungsprozesses könnte einen Anstieg der fakultativ aeroben Organismen im System bewirken, während zusätzlich ungenutzter Sauerstoff zur Hemmung der exoelektrogenen Gruppe führt. Beiden Faktoren würden das Substratgleichgewicht zu Gunsten der aeroben Organismen verschieben, wobei die respiratorisch erzeugten Elektronen vermehrt auf Sauerstoff und nicht auf die Elektrode übertragen werden würden (Quan *et al.*, 2012). Im Weiteren müsste dies mit einer geringen Stromdichte und hohen DOC- bzw. Säureabbaurate einhergehen, die wie in Abb. 20 und Tab. 21 ab Tag 17 zu beobachten war. Im gleichen Zuge könnte eine Sauerstoffkontamination auch die in der Durchflussphase (Tag 0 bis 17) eingeschränkte Anpassung der Gemeinschaft erklären, wobei ein zusätzlicher toxischer Sauerstoffreiz neben dem Reiz der Hydrolyseflüssigkeit die Anpassungsfähigkeit der exoelektrogenen Organismen stark reduziert. In diesem Fall wäre Sauerstoff jedoch auch ein limitierender Faktor der fakultativ aeroben Gruppe. Die Gruppe würde hierbei zu einer Gruppengröße anwachsen, für die der kontinuierliche Sauerstoffeintrag zur Versorgung noch ausreicht. Unter dieser Annahme würde die Sauerstoffkonzentration über den Prozess kontinuierlich sinken, was der Hemmung der exoelektrogenen Gruppe entgegenwirken könnte. Die Folgen wären eine Stagnation des aeroben Wachstums, während die exoelektrogenen Organismen, durch die wegfallende Hemmung und der weiteren Zugänglichkeit des Elektronenakzeptors (Anode) nun zu einer besseren Energieversorgung gelangen würden. Der einhergehende Anstieg der exoelektrogenen Gruppe würde eine Steigerung der Stromdichte nach sich ziehen, wie sie ab Tag 26 zu beobachten ist. Darüber hinaus deutet auch die Abbauhierarchie von Acetat, Butyrat gefolgt von Propionat aus thermodynamischen Gesichtspunkten darauf hin, dass ab diesem Zeitpunkt ein dominierender exoelektrogener Abbau der Säuren erfolgt. Mit steigender Acetat- und Butyrat-Abbau-Kinetik erreichte die Stromdichte ihr Maximum an Tag 38 mit $749 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ und überdies wurden $1,75 \text{ g/l}$ des DOC und $1,67 \text{ g/l}$ des DOC_{VFA} abgebaut. Die ermittelte CE dieses Zeitraums (Tag 26 bis 38) von 95 % zeigt dabei auf, dass hochspezifisch Acetat und Butyrat abgebaut wurden, während Propionat im System verbleibt. Erst bei niedrigen Acetat- und Butyrat-Konzentrationen war ein erneuter Propionat-Abbau zu beobachten (ab Tag 38 folgend), was vergleichbar mit dem Prozessverlauf von Schmidt und Kollegen (2018) ist. Der vollständige Abbau der Säuren ist durch den Prozesseinbruch gekennzeichnet.

Im Überblick könnte die im Verlauf des rezirkulierenden Betriebes ermittelte geringe Gesamt-CE (50 %) die Folge einer Sauerstoffkontamination sein, welche auf den Aufbau des zwei-Kammersystems zurückzuführen ist.

Der Sauerstoffeintrag in solchen Systemen ist so gut wie unvermeidbar und wird in Fachkreisen vielfältig diskutiert (Asghar *et al.*, 2015; Ezziat *et al.*, 2019; Liu & Cheng, 2014). Selbst unter optimalen Laborbedingungen können die Risiken für solche Kontaminationen nur durch das Arbeiten in einem Anaerobenzelt oder einer argon-gefluteten Kammer minimiert werden.

Diese Methoden sind jedoch gerade in Bezug auf anwendungsorientierte Großanlagen technisch nicht umsetzbar. Die in dieser Arbeit gewählten Bedingungen könnten jedoch eine ideale Lösung für diese Problematik darstellen. Die Prozessführung mit den aus der Umweltprobe angereicherten Organismen – einer Mischkultur aus exoelektrogenen und fakultativ aeroben Organismen – führt zu einem sich selbstregulierenden mikrobiologischen System, wobei somit auch die Prozessführung in größeren Reaktoren mit gesteigertem Risiko des Sauerstoffeintrags erlaubt ist. Die heterogene Mischkultur ist damit befähigt, das System sauerstofffrei zu halten und sich selbstregulierend der Sauerstoffkonzentration anzupassen. Auch wenn die meisten Prozessstrategien auf diesem Gebiet exoelektrogene Reinkulturen nutzen, um damit eine maximale Effizienz zu erreichen, zeigen die Ergebnisse, dass trotz der Anwesenheit fakultativ aerober Organismen und einer Sauerstoffkontamination ein besonders stabiler und hoch effizienter Prozess etabliert werden konnte. So erreichten He und Kollegen (2005) in einem zwei-Kammersystem im rezirkulierenden Betrieb nur eine Effizienz von 8,1 % und eine DOC-Abbauraten von 90 %, wobei dies auf einen erhöhten Sauerstoffeintrag und der Abwesenheit aerober Organismen zurückzuführen ist. Ähnliches konnte auch Rabaey und Kollegen (2005) zeigen, wobei durch sauerstoffbelastetes Abwasser 96 % des DOC abgebaut wurde und nur eine CE von 22 % erreicht wurde.

Im Überblick konnte mittels einer spezifischen exoelektrogenen Mischkultur die selektive Acetat- und Butyrat-Elimination aus der Hydrolyseflüssigkeit erzielt werden, welche darüber hinaus mit einer CE von 95 % und einer mittleren Stromdichte von bis zu 623 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ korrelierte. Im Vergleich zu einer Studie von Schmidt und Kollegen (2018), in der die anodische Acetat- und Butyrat-Oxidation aus einem Hydrolysat lediglich mit einer CE von 45 % und Stromdichte von 177 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ einherging, verdeutlicht dies, dass die in dieser Arbeit gewählte Vorgehensweise einen hoch effektiven bioelektrochemischen Prozess ermöglicht, der die bisherigen Maßstäbe mehr als verdoppelt. Dies ist zum einen auf die Zusammensetzung der exoelektrogenen Mischkultur zurückzuführen und zum anderen auf die optimierte Fließzelle, welche durch ein vorteilhaftes Reaktionsvolumen und der daraus resultierenden verbesserten Biofilmversorgung ausgezeichnet ist. Darüber hinaus ist durch die Abbauhierarchie der organischen Säuren theoretisch eine Rückhaltung von Propionat möglich, während die Elektronen der Acetat- und Butyrat-Oxidation der Wasserstoffproduktion dienen.

Wie bereits genannt, stellen sowohl Propionat als auch Wasserstoff wirtschaftlich interessante Produkte dar, wobei die biotechnologische Veredelung beider Produkte in Acetoin einen Produkterzeugungsvorteil des Gesamtprozesses ermöglicht. Inwieweit beiden Produkte für die biokatalytische Acetoin-Produktion geeignet sind und welchen Einfluss Rückstände von Acetat und Butyrat auf diese Umsetzung haben, ist ungeklärt. Im nachfolgenden Abschnitt sollte daher die Acetoin-Synthese unter verschiedenen synthetischen Prozessbedingungen näher untersucht werden, um aus den Erkenntnissen eine optimale bioelektrochemische Verfahrensstrategie abzuleiten, die eine Effektive biokatalytische Acetoin-Produktion ermöglicht.

4.4 Biokatalytische Veredelung – Acetoin-Produktion

Das Konzept der Bioraffinerie erweitert die Möglichkeit der Wertschöpfung aus organischen Abfallstoffen, wobei die Rentabilität solcher Prozessstraßen durch die Wertigkeit des erzeugten Produktes definiert ist (Alibardi *et al.*, 2020). Im Fokus solcher Prozesse stehen zumeist Plattformchemikalien, deren chemische Charakteristika die Integration in existierende Prozessrouten erlauben und dadurch eine zukünftige bio-basierte chemische Industrie auf Basis weniger Ausgangsstoffe ermöglichen könnte (Jang *et al.*, 2012). Acetoin stellt eines dieser Moleküle dar, dessen Anwendungsspektrum und prognostizierter steigender Umsatz ausschlaggebend war (vgl. Abschnitt 1.5.1), es als Endprodukt der in dieser Arbeit vorgestellten Prozessstraße zu produzieren.

Die biokatalytische Produktion ist bereits in der Literatur beschrieben (Bursac *et al.*, 2017; Förster *et al.*, 2017; Schmidt *et al.*, 2018; Windhorst & Gescher, 2019), wobei die mixotrophe Erzeugung auf Basis einer vorangegangenen Dunkelfermentation und bioelektrochemischen Behandlung bisher noch nicht untersucht wurde. Die Herausforderung stellt hierbei die physiologische Eignung des Biokatalysators dar, wobei sowohl die Metabolisierung der gasförmigen (H_2 , CO_2) als auch löslichen (Acetat, Butyrat, Propionat) Produkte gegeben sein muss. Auf Grundlage dieser Kriterien wurde auf ein durch Windhorst (2019) modifiziertes Knallgasbakterium zurückgegriffen, das neben der hydrogenotrophen CO_2 -Fixierung auch zur Metabolisierung von Acetat, Propionat und Butyrat befähigt ist (Abb. 4). Ziel der in Abschnitt 3.6 dargestellten Untersuchungen war es, die Acetoin-Produktion unter verschiedenen theoretischen Prozessszenarien zu untersuchen, um dadurch die optimale Zusammensetzung des anodischen Restflusses zu identifizieren. Neben verschiedenen heterotrophen Bedingungen wurden auch mixotrophe Szenarien untersucht, wobei die jeweilig erreichten Acetoin-Kohlenstoffeffizienzen als Übersicht in Abb. 26 dargestellt sind. Die Ermittlung der Ausbeuten erfolgte nach der in Abschnitt 2.17.1 dargestellten Vorgehensweise.

In einer initialen heterotrophen Untersuchungsreihe sollte zunächst der Einfluss einer Mischung aus Acetat, Propionat und Butyrat in Bezug auf die *C. necator*-basierte Acetoin-Produktion untersucht werden. Hierbei trat ein bakterielles Wachstum erst nach 24 Stunden auf, das simultan mit dem Abbau aller drei Säuren korrespondierte (Abb. 21). Mit einer Kohlenstoffeffizienz von 35 % ist zunächst gezeigt, dass der Produktionsstamm ein geeigneter Biokatalysator für einen organischen Säureeffluent darstellt. Um mögliche Unterschiede der Acetoin-Produktion in Bezug auf einen variierenden anodischen Prozessstrom aufzudecken, wurde im Weiteren auch die individuelle Bereitstellung der Carboxylsäuren untersucht.

Im Vergleich zu der getesteten Mischung wurde auch hier unter allen Bedingungen ein Wachstum mit dem Verbrauch der jeweiligen Säuren festgestellt (Abb. 22). Die höchste optische Dichte wurde unter der Zugabe von Butyrat beobachtet, wobei dies auf die höhere Menge an bereitgestellten organischen Kohlenstoff zurückzuführen ist. Im Vergleich ist Butyrat eine C₄-Verbindung, während Acetat und Propionat eine C₂- bzw. C₃-Verbindung darstellen. Interessanterweise wurde die höchste Effizienz unter der Zugabe von Propionat ermittelt, die mit 46 % deutlich höher im Vergleich zu Acetat (34 %) und Butyrat (13 %) ist. Bei näherer Betrachtung der jeweiligen metabolischen Abbauwege erscheint dies schlüssig, da der Abbau von Propionat über Pyruvat erfolgt, das im Weiteren als Ausgangssubstrat der heterologen Acetoin-Synthese dient (vgl. Abb. 4, orange). Neben den organischen Säuren stehen ebenfalls CO₂ und H₂ als gasförmige Nebenprodukte der anodischen Oxidation und kathodischen H₂-Produktion als Substrat im Prozess zur Verfügung. In weiteren Schritten wurde daher die mixotrophe Umsetzung untersucht, um festzustellen, inwieweit die Effizienz der Acetoin-Produktion beeinflusst ist. In den durchgeführten mixotrophen Untersuchungen limitierte weder H₂, CO₂ noch O₂ den Metabolismus des Produktionsstammes. Erneut erwies sich Propionat als favorisierte Substratquelle für die Acetoin-Produktion (71 %), gefolgt von Acetat (17 %) und Butyrat (16 %). Interessanterweise wurde hierbei der Abbau von Acetat und Butyrat mit einem gleichzeitigen Verbrauch von H₂ und CO₂ beobachtet, während sich für Propionat ein typisches diauxisches Konsumverhalten abzeichnete (Abb. 23). Der Abbau von Acetat und Butyrat ähneln sich metabolisch stark, wobei Acetyl-CoA gebildet wird, das anschließend dem zentralen Energiestoffwechsel dient (vgl. Abb. 4 blau & braun). Hingegen erfordert der Aufbau von Zuckermolekülen für anabole Zwecke die energieaufwendige Umwandlung von Acetyl-CoA in eine C₃-Verbindung. Im Gegensatz dazu führt die CO₂-Fixierung mittels des Calvin-Zyklus zur Produktion von C₃-Verbindungen, die für anabole Zwecke genutzt werden können (vgl. Abb. 4 ocker & violett).

Interessanterweise war die Effizienz der Acetoin-Produktion unter mixotrophen Wachstumsbedingungen mit Acetat und Butyrat geringer im Vergleich zur heterotrophen Testreihe. Eine mögliche Erklärung ist, dass das mixotrophe Wachstum zum Verbrauch von H_2 und CO_2 für anabole Zwecke führt, während Butyrat und Acetat hauptsächlich dem Energiestoffwechsel dienen. Dies würde auch erklären, weshalb die Kohlenstoffeffizienz der Acetoin-Produktion unter mixotrophen Bedingungen für Acetat und Butyrat im Vergleich zum heterotrophen Wachstum deutlich geringer ist. Mit anderen Worten – wenn kein Bedarf für die Produktion von C_3 -Verbindungen aus Acetat und Butyrat besteht, ist auch weniger Pyruvat verfügbar, das der Acetoin-Produktion dienen kann.

In einer weiteren Untersuchung wurde dem Produktionsstamm ein Gemisch der drei Säuren zur Verfügung gestellt, wobei die ermittelte Kohlenstoffeffizienz dem Durchschnitt aller Kohlenstoffeffizienzen der mit den einzelnen Carboxylsäuren durchgeführten mixotrophen Experimente entspricht (34 %). Eine weitere Beobachtung stellt der Unterschied in der ermittelten Propionat- und Acetat-Abbaukinetik dar. Sowohl für die mixotrophen als auch für die heterotrophen Untersuchungsreihen scheint die Zugabe von Butyrat den Abbau von Acetat und Propionat zu verringern, während die Zugabe von Acetat und Propionat zu einem schnelleren Verbrauch im Vergleich zu den Experimenten mit allen drei Säuren führt. Eine eindeutige Erklärung kann nicht gegeben werden, es wäre jedoch denkbar, dass die drei Säuren über die gleiche Importmaschinerie aufgenommen werden, die eine theoretisch schnellere Verbrauchskinetik durch eine geringere Verfügbarkeit verschleiern könnten. Im Umkehrschluss würde dies darauf hindeuten, dass der Säureimport ein limitierender Faktor für Acetat und Propionat ist, während der insgesamt geringere Butyrat-Katabolismus nicht transportlimitiert wäre.

Im Überblick zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass der verwendete Produktionsstamm ein geeigneter Biokatalysator ist, der ausgehend von den Zwischenprodukten der Prozesskaskade die Acetoin-Produktion ermöglicht. Die höchste Ausbeute wurde hierbei mit Propionat unter mixotrophen Bedingungen (> 70 %) erzielt, was im Vergleich zur heterotrophen Produktion einer Effizienzsteigerung von ca. 55 % entspricht und auf die zusätzliche Bereitstellung von CO_2 und H_2 zurückzuführen ist. Wasserstoff als Produkt der bioelektrochemischen Acetat- und Butyrat-Oxidation bildet somit ein in der Prozesskaskade erzeugtes Zwischenprodukt, was zur Effizienzsteigerung der Acetoin-Synthese führt und damit eine neue vielversprechenden Prozessstrategie ermöglicht. Gerade im Vergleich zu bisherigen biotechnologischen Ansätzen, wird die mixotrophe Substratnutzung zur Acetoin-Synthese durch die Ergebnisse dieser Arbeit noch einmal hervorgehoben.

So zeigte Bursac (2019), dass unter Verwendung von Lactat und Glycerin in einem elektrofermentativen Ansatz Acetoin-Ausbeuten von lediglich 50 % erreicht werden konnten, während Schmidt (2019) unter anaeroben Bedingungen und der Verwendung von Propionat nur eine Ausbeute von ca. 45 % erzielte. Im Kontext des Gesamtprozesses zeigen die Erkenntnisse dieser Arbeit, dass die direkte Acetoin-Synthese basierend auf Acetat und Butyrat nicht nur weniger effizient als Propionat ist, sondern auch, dass die indirekte Nutzung in Form von H₂ (bioelektrochemischer Abbau) mit Propionat die Effizienz um ca. 55 % steigert. In Kombination mit der gezielten bioelektrochemischen Elimination von Acetat- und Butyrat können dadurch ideale Substratbedingungen für die *C. necator*-basierte Acetoin-Produktion geschaffen werden, was die Produktion von Plattformchemikalien aus hoch diversen biogenen Abfallstoffen ermöglicht.

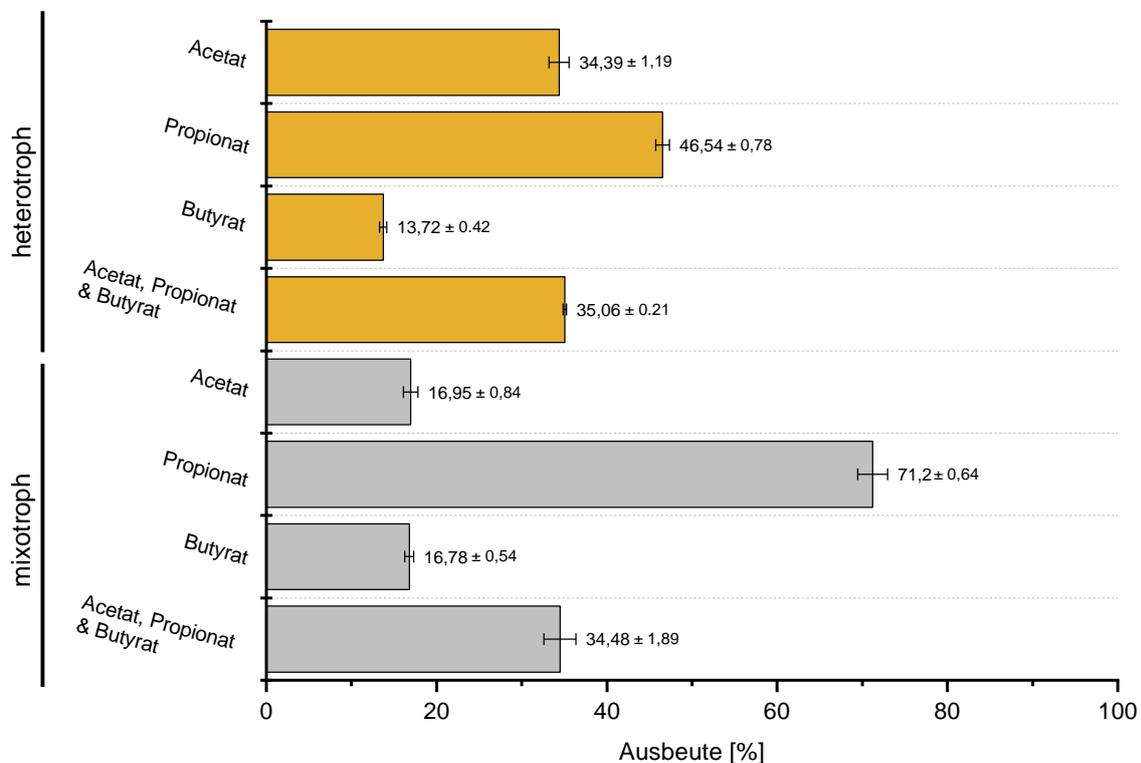


Abb. 26: Gesamtausbeuten an Acetoin entsprechend den getesteten Bedingungen und Substraten. Die individuelle Summenformel für die Umsetzung der Carboxylsäuren zu Acetoin sind in Abschnitt 2.17.1 dargestellt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der drei biologischen Replikate dar.

5. Ausblick

Die Notwendigkeit eine zukünftige Ressourcen- und Energieknappheit zu überwinden, gibt Anlass zur Entwicklung innovativer und praktischer Technologien für die Produktion nützlicher Stoffe aus biogenen Abfallströmen. Die in dieser Arbeit untersuchte Prozessstraße stellt eine neuartige technologische Kaskadennutzung vor, welche die direkte stoffliche Nutzung biogener Abfallströme in höherwertige Produkte ermöglicht.

Den entscheidenden Schritt des Prozesses übernimmt die bioelektrochemische Behandlung des Hydrolysats, wobei eine hoch effiziente und robuste exoelektrogene Mischkultur etabliert wurde. Als funktionaler Hauptakteur der anoden-gestützten Butyrat-Oxidation wurde eine neuartige *Geobacter bemidjiensis* Subspezies identifiziert, von der bisher angenommen wird, dass diese nicht zur Elektrodenreduktion befähigt ist (Nevin *et al.*, 2005). Abseits des vorgestellten Prozesses könnte durch die Isolation des Organismus und einer genetischen Charakterisierung ein umfassender Einblick in die Physiologie gegeben werden, der zur Entschlüsselung der beobachteten Elektrodenreduktion führen könnte. In Bezug auf die anwendungsorientierte bioelektrochemische Behandlung der Hydrolyseflüssigkeit, zeichnete sich nach der Prozessstabilisierung eine Abbauhierarchie ab, wobei Acetat gefolgt von Butyrat und Propionat eliminiert wurde. Da Propionat das geeignetste Substrat der nachfolgenden Acetoin-Synthese ist, ist es für den Gesamtprozess entscheidend, dies als einzige Verbindung aus dem anodischen Fluss zu isolieren. Hierbei könnten verfahrenstechnische Maßnahmen ergriffen werden, wobei durch die Kombination aus kontinuierlicher Prozessführung und optimierter hydraulischer Verweilzeit die bevorzugte Acetat- und Butyrat-Oxidation ermöglicht wird, sodass Propionat die einzige heterotrophe Verbindung im isolierten Prozessstrom bildet. Auch wenn damit der Grundstein für die finale Veredelung eines synthetischen anodischen Restflusses gezeigt ist, steht die biokatalytische Veredelung eines echten anodischen Restflusses noch aus.

Dieser könnte in eine mikrobielle Elektrosynthese-Zelle übertragen werden, um die kathodische mixotrophe Acetoin-Produktion zu untersuchen (vgl. Abb. 2 C). Als Evaluationssystem bietet sich das Fließzellenmodell von Hackbarth und Kollegen (2020) an, wobei die Kultivierung eines elektroautotrophen Knallgasbakteriums bereits gezeigt ist. Die Besonderheit dieses Systems bildet dessen Bildgebungsverfahren, wobei nicht-invasiv und kontinuierlich, die Biofilmentwicklung wie die Dicke oder Kompaktheit über den Prozess erfasst und mit Faktoren wie z.B. der Flussgeschwindigkeit in Korrelation gebracht werden kann.

Die Erarbeitung solcher Faktoren würde die Ableitung geeigneter Prozessbedingungen erlauben, um so eine optimale Auslegung des Gesamtprozesses zu ermöglichen. Neben den verfahrenstechnischen Optimierungen, ermöglicht die genetische Zugänglichkeit des Produktionsstamms auch die Produktion weiterer wirtschaftlich interessanter Plattformchemikalien. Denkbar wäre neben der Erzeugung von 2,3-Butandiol (Windhorst & Gescher, 2019) auch die Produktion von Alkoholen oder Aminosäuren (Pachapur *et al.*, 2016).

Unter dem Aspekt der Wirtschaftlichkeit ermöglicht der in dieser Arbeit gewählte Maßstab keine industrielle Umsetzung der Reaktionskaskade. Hierbei ist die Hochskalierung eines geeigneten bioelektrochemischen Reaktorsystems unabdingbar, um eine wirtschaftliche industrielle Umsetzung des Prozesses zu ermöglichen. Die Herausforderungen, die sich dabei stellen, sind sowohl technischer, operativer und biologischer Natur, wobei eine verfahrenstechnische Optimierung aller Ebenen, schlussendlich das größte Potential zur Effizienzsteigerung des Gesamtprozesses bieten würde.

6. Literaturverzeichnis

- Aklujkar, M., Krushkal, J., Di Bartolo, G., Lapidus, A., Land, M. L. & Lovley, D. R. (2009). The genome sequence of *Geobacter metallireducens*: features of metabolism, physiology and regulation common and dissimilar to *Geobacter sulfurreducens*. *BMC microbiology*, 9, 109. BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-109>
- Aklujkar, M., Young, N. D., Holmes, D., Chavan, M., Risso, C., Kiss, H. E. *et al.* (2010). The genome of *Geobacter bemidjiensis*, exemplar for the subsurface clade of *Geobacter* species that predominate in Fe(III)-reducing subsurface environments. *BMC Genomics*, 11(1), 490. BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-490>
- Al-Naji, M., Van Aelst, J., Liao, Y., D'Hullian, M., Tian, Z., Wang, C. *et al.* (2020). Pentanoic acid from γ -valerolactone and formic acid using bifunctional catalysis. *Green Chemistry*, 22(4), 1171–1181. Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/C9GC02627D>
- Ali, R., Saravia, F., Hille-Reichel, A., Härrer, D., Gescher, J. & Horn, H. (2020). Enhanced production of propionic acid through acidic hydrolysis by choice of inoculum. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 1(10), 29–65. John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/jctb.6529>
- Alibardi, L., Astrup, T. F., Asunis, F., Clarke, W. P., De Gioannis, *et al.* (2020). Organic waste biorefineries: Looking towards implementation. *Waste Management*, 114, 274–286. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.07.010>
- Alvarez-Ortega, C. & Harwood, C. S. (2007). Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to low oxygen indicate that growth in the cystic fibrosis lung is by aerobic respiration. *Molecular Microbiology*, 65(1), 153–165. NIH Public Access. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05772.x>
- Amano, Y., Koto, A., Matsuzaki, S., Sakamoto, H., Satomura, T. & Suye, S. I. (2016). Construction of a biointerface on a carbon nanotube surface for efficient electron transfer. *Materials Letters*, 174, 184–187. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2016.03.113>
- Anderson, R. T., Vrionis, H. A., Ortiz-Bernad, I., Resch, C. T. *et al.* (2003). Stimulating the In Situ Activity of *Geobacter* Species To Remove Uranium from the Groundwater of a Uranium-Contaminated Aquifer. *Applied and environmental Microbiology*, 69(10), 584–591. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.10.5884-5891.2003>
- Andreesen, J. R., Bahl, H. & Gottschalk, G. (1989). Introduction to the Physiology and Biochemistry of the Genus *Clostridium*. *Clostridia* (S. 27–62). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9718-3_2
- Anraku, Y. (1988). Bacterial Electron Transport Chains. *Annual Review of Biochemistry*, 57(1), 101–132. Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.57.070188.000533>

- Arenas-López, C., Locker, J., Orol, D., Walter, F., Busche, T., Kalinowski, J. *et al.* (2019). The genetic basis of 3-hydroxypropanoate metabolism in *Cupriavidus necator* H16. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 150. BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1489-5>
- Armaroli, N. & Balzani, V. (2016). Solar Electricity and Solar Fuels: Status and Perspectives in the Context of the Energy Transition. *Chemistry - A European Journal*, 22(1), 32–57. Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/chem.201503580>
- Arnott, P. M., Joshi, H., Aksimentiev, A. & Howorka, S. (2018). Dynamic Interactions between Lipid-Tethered DNA and Phospholipid Membranes. *Langmuir*, 34(49), 15084–15092. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b02271>
- 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 Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.128>
- Asghar, A., Abdul Raman, A. A. & Wan Daud, W. M. A. (2015). Challenges and recommendations for using membranes in wastewater-based microbial fuel cells for in situ Fenton oxidation for textile wastewater treatment. *Reviews in Chemical Engineering*, 31(1), 45–67. Walter de Gruyter GmbH. <https://doi.org/10.1515/revce-2014-0030>
- Azizi Samir, M. A. S., Alloin, F. & Dufresne, A. (2005). Review of recent research into cellulosic whiskers, their properties and their application in nanocomposite field. *Biomacromolecules*. Biomacromolecules. <https://doi.org/10.1021/bm0493685>
- Bajracharya, S., Srikanth, S., Mohanakrishna, G., Zacharia, R., Strik, D. P. & Pant, D. (2017). Biotransformation of CO₂ in bioelectrochemical systems: State of the art and future prospects. *Journal of Power Sources*, 356, 256–273. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2017.04.024>
- Barker, P. D. & Ferguson, S. J. (1999). Still a puzzle: Why is haem covalently attached in c-type cytochromes? *Structure*, 7(12), 281–290. Current Biology Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)88334-3](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)88334-3)
- Bastidas-Oyanedel, J.-R., Bonk, F., Thomsen, M. H. & Schmidt, J. E. (2015). Dark fermentation biorefinery in the present and future (bio)chemical industry. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 14(3), 473–498. Kluwer Academic Publishers. <https://doi.org/10.1007/s11157-015-9369-3>
- Beadle, C. L. & Long, S. P. (1985). Photosynthesis - is it limiting to biomass production? *Biomass*, 8(2), 119–168. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/0144-4565\(85\)90022-8](https://doi.org/10.1016/0144-4565(85)90022-8)
- Beblway, S. (2020). *Anodische Elektrofermentation von Acetoin in Escherichia coli*. Karlsruher Institut für Technologie (KIT). <https://doi.org/10.5445/IR/1000096259>
- Berger, C. & Rosenbaum, M. A. (2017). Spontaneous quorum sensing mutation modulates electroactivity of *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Bioelectrochemistry*, 117, 1–8. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2017.04.006>

- Bolger, A. M., Lohse, M. & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Bond, D. R. & Lovley, D. R. (2003). Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3), 1548–1555. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.3.1548-1555.2003>
- Boyaval, P. & Corre, C. (1995). Production of propionic acid. *Le Lait, INRA Editions*, 75(5), 453–461.
- Brandon, A. M. & Criddle, C. S. (2019). Can biotechnology turn the tide on plastics? *Current Opinion in Biotechnology*, 57, 160–166. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.03.020>
- Bretschger, O., Obraztsova, A., Sturm, C. A., In, S. C., Gorby, Y. A., Reed, S. B. *et al.* (2007). Current production and metal oxide reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 wild type and mutants. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(21), 7003–7012. <https://doi.org/10.1128/AEM.01087-07>
- Breznak, J. A. (2006). The Genus *Sporomusa*. *The Prokaryotes* (S. 991–1001). Springer US. https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3_34
- Bruijninx, P. C. A. & Weckhuysen, B. M. (2013). Shale gas revolution: An opportunity for the production of biobased chemicals? *Angewandte Chemie - International Edition*. <https://doi.org/10.1002/anie.201305058>
- Brun, N., Hesemann, P. & Esposito, D. (2017). Expanding the biomass derived chemical space. *Chemical Science*, 8(7), 4724–4738. Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c7sc00936d>
- Brunner, G. (2005). Supercritical fluids: Technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering*, 67(1–2), 21–33. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.05.060>
- Brunner, S., Klessing, T., Dötsch, A., Sturm-Richter, K. & Gescher, J. (2019). Efficient Bioelectrochemical Conversion of Industrial Wastewater by Specific Strain Isolation and Community Adaptation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 1–23. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00023>
- Buchfink, B., Xie, C. & Huson, D. H. (2014). Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nature Methods*, 12(1), 59–60. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3176>
- Buckel, W. & Thauer, R. K. (2018). Flavin-Based Electron Bifurcation, A New Mechanism of Biological Energy Coupling. *Chemical Reviews*, 118(7), 3862–3886. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00707>

- Burkhardt, E. M., Bischoff, S., Akob, D. M., Büchel, G. & Küsel, K. (2011). Heavy metal tolerance of Fe(III)-reducing microbial communities in contaminated creek bank soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(9), 3132–3136. American Society for Microbiology (ASM). <https://doi.org/10.1128/AEM.02085-10>
- Bursac, T., Gralnick, J. A. & Gescher, J. (2017). Acetoin production via unbalanced fermentation in *Shewanella oneidensis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 114(6), 1283–1289. <https://doi.org/10.1002/bit.26243>
- Bursac, T., (2019). *Synthese von Acetoin und 2,3-Butandiol durch Mikroben-Elektroden-Interaktion mit S. oneidensis*. Karlsruher Instituts für Technologie (KIT). <http://doi.org/10.5445/IR/1000094022>
- Butler, J. E., Young, N. D. & Lovley, D. R. (2010). Evolution of electron transfer out of the cell: Comparative genomics of six *Geobacter* genomes. *BMC Genomics*, 11(1), 1–12. BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-40>
- Buzby, J. C., Wells, H. F. & Hyman, J. (2014). The estimated amount, value, and calories of postharvest food losses at the retail and consumer levels in the United States. *Food Loss in the United States: Selected Analyses* (S. 1–42). Nova Science Publishers, Inc. <https://doi.org/10.2139/ssrn.2501659>
- Call, D. & Logan, B. E. (2008). Hydrogen production in a single chamber microbial electrolysis cell lacking a membrane. *Environmental Science and Technology*, 42(9), 3401–3406. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/es8001822>
- Campione, A., Gurreri, L., Ciofalo, M., Micale, G., Tamburini, A. & Cipollina, A. (2018). Electrodialysis for water desalination: A critical assessment of recent developments on process fundamentals, models and applications. *Desalination*, 434, 121–160. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2017.12.044>
- 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. American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/AEM.01387-07>
- Cao, Q., Kumru, B., Antonietti, M. & Schmidt, B. V. K. J. (2020). Graphitic carbon nitride and polymers: A mutual combination for advanced properties. *Materials Horizons*, 7(3), 762–786. Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c9mh01497g>
- Cappai, G. De Gioannis, G., Friargiu, M., Massi, E., Muntoni, A., Poletini, A. *et al.* (2014). An experimental study on fermentative H₂ production from food waste as affected by pH. *Waste Management*, 34(8), 510–519 <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.05.011>
- Caspeta, L., Buijs, N. A. A. & Nielsen, J. (2013). The role of biofuels in the future energy supply. *Energy and Environmental Science*, 6(4), 1077–1082. Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c3ee24403b>

- Cesare, A., Fontaneto, D., Doppelbauer, J. & Corno, G. (2016). Fitness and Recovery of Bacterial Communities and Antibiotic Resistance Genes in Urban Wastewaters Exposed to Classical Disinfection Treatments. *Environmental Science and Technology*, 50(18), 10153–10161. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02268>
- Chen, Y., Li, X., Zheng, X. & Wang, D. (2013). Enhancement of propionic acid fraction in volatile fatty acids produced from sludge fermentation by the use of food waste and *Propionibacterium acidipropionici*. *Water Research*, 47(2), 615–622. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.10.035>
- Cheng, S. & Logan, B. E. (2007). Sustainable and efficient biohydrogen production via electrohydrogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(47), 18871–18873. National Academy of Sciences. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706379104>
- Cherubini, F. (2010). The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*, 51(7), 1412–1421. Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.01.015>
- Clark, J. H., Luque, R. & Matharu, A. S. (2012). Green chemistry, biofuels, and biorefinery. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 3, 183–207. Annu Rev Chem Biomol Eng. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-062011-081014>
- Coaxes, J. D., Phillips, E. J. P., Lonergan, D. J., Jenter, H. & Lovley, D. R. (1996). Isolation of *Geobacter* species from diverse sedimentary environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(5), 1531–1536. American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/aem.62.5.1531-1536.1996>
- Coppi, M. V. (2005). The hydrogenases of *Geobacter sulfurreducens*: A comparative genomic perspective. *Microbiology*, 151(4), 1239–1254. Microbiology Society. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27535-0>
- Cusick, R. D., Kiely, P. D. & Logan, B. E. (2010). A monetary comparison of energy recovered from microbial fuel cells and microbial electrolysis cells fed winery or domestic wastewaters. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(17), 8855–8861. Elsevier Limited. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.06.077>
- Dolch, K. J. (2014). *Stabilität und Leistungsfähigkeit von gezielt gezüchteten Biofilmen auf Anoden*. <https://doi.org/10.5445/IR/1000044735>
- Doyle, L. E. & Marsili, E. (2015). Methods for enrichment of novel electrochemically-active microorganisms. *Bioresource Technology*, 195, 273–282. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.025>
- Dubé, C. D. & Guiot, S. R. (2015). Direct interspecies electron transfer in anaerobic digestion: A review. *Biogas Science and Technology* (S. 101–115). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-21993-6_4

- Duppeti, H., Chakraborty, S., Das, B. S., Mallick, N. & Kotamreddy, J. N. R. (2017). Rapid assessment of algal biomass and pigment contents using diffuse reflectance spectroscopy and chemometrics. *Algal Research*, 27, 274–285. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.09.016>
- Dusselier, M. & Sels, B. F. (2014). Selective catalysis for cellulose conversion to lactic acid and other α -hydroxy acids. *Topics in Current Chemistry*, 353, 85–126. Springer Verlag. https://doi.org/10.1007/128_2014_540
- Eddy, S. R. (2009). A new generation of homology search tools based on probabilistic inference. *Genome informatics. International Conference on Genome Informatics*, 23(1), 205–211. https://doi.org/10.1142/9781848165632_0019
- Edel, M., Horn, H. & Gescher, J. (2019). Biofilm systems as tools in biotechnological production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(13), 5095–5103. Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09869-x>
- Esposito, D. & Antonietti, M. (2015). Redefining biorefinery: the search for unconventional building blocks for materials. *Chemical Society Reviews*, 44(16), 5821–5835. Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c4cs00368c>
- Ezziat, L., Elabed, A., Ibsouda, S. & El Abed, S. (2019). Challenges of Microbial Fuel Cell Architecture on Heavy Metal Recovery and Removal From Wastewater. *Frontiers in Energy Research*, 7(1), 1. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2019.00001>
- Fairley, P. (2011). Introduction: Next generation biofuels. *Nature*, 474(7352 SUPPL.), 2–5. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/474S02a>
- FAO. (2016). *Global Food Losses and Food Waste*. ISBN 978-92-5-107205-9 <http://www.fao.org/3/i2697e/i2697e.pdf>
- Förster, A. H., Beblawy, S., Golitsch, F. & Gescher, J. (2017). Electrode-assisted acetoin production in a metabolically engineered *Escherichia coli* strain. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 65. BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0745-9>
- Franke-Whittle, I. H., Walter, A., Ebner, C. & Insam, H. (2014). Investigation into the effect of high concentrations of volatile fatty acids in anaerobic digestion on methanogenic communities. *Waste Management*, 34(11), 2080–2089. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.07.020>
- Fredrickson, J. K., Kota, S., Kukkadapu, R. K., Liu, C. & Zachara, J. M. (2003). Influence of electron donor/acceptor concentrations on hydrous ferric oxide (HFO) bioreduction. *Biodegradation*, 14(2), 91–103. <https://doi.org/10.1023/A:1024001207574>
- Fuchs, G., Eitinger, T., Heider, J., Kemper, B., Kothe, E., Schink, B. *et al.* (2017). *Allgemeine Mikrobiologie* (10. Auflag.). Stuttgart: Georg Thieme Verlag. <https://doi.org/10.1055/b-002-44938>

- Ghimire, A., Frunzo, L., Pontoni, L., d'Antonio, G., Lens, P. N. L., Esposito, G. *et al.* (2015). Dark fermentation of complex waste biomass for biohydrogen production by pretreated thermophilic anaerobic digestate. *Journal of Environmental Management*, 152, 43–48. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.12.049>
- Giroto, F., Alibardi, L. & Cossu, R. (2015). Food waste generation and industrial uses: A review. *Waste Management*, 45, 32–41. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.06.008>
- 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. Biosens Bioelectron. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.03.010>
- Golitsch Frederik. (2016). *Entwicklung bioelektrochemischer Systeme für die Untersuchung von elektrodenabhängigen Konversionsprozessen*. Karlsruhe Institut für Technologie (KIT). <http://doi.org/10.5445/IR/1000067136>
- Goswami, R., Chattopadhyay, P., Shome, A., Banerjee, S. N., Chakraborty, A. K., Mathew, A. K. *et al.* (2016). An overview of physico-chemical mechanisms of biogas production by microbial communities: A step towards sustainable waste management. *3 Biotech*, 6(1). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0395-9>
- Graham-Rowe, D. (2011). Agriculture: Beyond food versus fuel. *Nature*, 474(7352 SUPPL.), 1–25. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/474S06a>
- Gralnick, J. A. & Newman, D. K. (2007). Extracellular respiration. *Molecular Microbiology*, 65(1), 1–11. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05778.x>
- Grousseau, E., Lu, J., Gorret, N., Guillouet, S. E. & Sinskey, A. J. (2014). Isopropanol production with engineered *Cupriavidus necator* as bioproduction platform. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(9), 4277–4290. Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5591-0>
- Guan, N. & Liu, L. (2020). Microbial response to acid stress: mechanisms and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(1), 51–65. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10226-1>
- Guang, L., Koomson, D. A., Jingyu, H., Ewusi-Mensah, D. & Miwornunyuie, N. (2020). Performance of exoelectrogenic bacteria used in microbial desalination cell technology. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(3), 20–39. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijerph17031121>
- Gurtovenko, A. A. & Vattulainen, I. (2008). Effect of NaCl and KCl on Phosphatidylcholine and Phosphatidylethanolamine Lipid Membranes: Insight from Atomic-Scale Simulations for Understanding Salt-Induced Effects in the Plasma Membrane. *The Journal of Physical Chemistry B*, 112(7), 1953–1962. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/jp0750708>

- Gutiérrez-Sanz, O., Olea, D., Pita, M., Batista, A. P., Alonso, A., Pereira, M. M. *et al.* (2014). Reconstitution of respiratory complex I on a biomimetic membrane supported on gold electrodes. *Langmuir*, *30*(29), 9007–9015. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/la501825r>
- Hackbarth, M., Jung, T., Reiner, J. E., Gescher, J., Horn, H., Hille-Reichel, A. *et al.* (2020). Monitoring and quantification of bioelectrochemical *Kyrpidia spormannii* biofilm development in a novel flow cell setup. *Chemical Engineering Journal*, *390*(2). <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.124604>
- Hansen, M. C., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M. & Molin, S. (1998). Biased 16S rDNA PCR amplification caused by interference from DNA flanking the template region. *FEMS Microbiology Ecology*, *26*(2), 141–149. Oxford University Press (OUP). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1998.tb00500.x>
- Haveren, J. van, Scott, E. L. & Sanders, J. (2008). Bulk chemicals from biomass. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, *2*(1), 41–57. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/bbb.43>
- He, Z., Minteer, S. D. & Angenent, L. T. (2005). Electricity generation from artificial wastewater using an upflow microbial fuel cell. *Environmental Science and Technology*, *39*(14), 5262–5267. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/es0502876>
- Helling, R. B., Vargas, C. N. & Adams, J. (1987). Evolution of *Escherichia coli* during growth in a constant environment. *Genetics*, *116*(3), 349–358. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/genetics/116.3.349>
- Huang, B., Gao, S., Xu, Z., He, H. & Pan, X. (2018). The Functional Mechanisms and Application of Electron Shuttles in Extracellular Electron Transfer. *Current Microbiology*, *75*(1), 99–106. Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s00284-017-1386-8>
- Huerta-Cepas, J., Szklarczyk, D., Forslund, K., Cook, H., Heller, D., Walter, M. C. *et al.* (2016). EGGNOG 4.5: A hierarchical orthology framework with improved functional annotations for eukaryotic, prokaryotic and viral sequences. *Nucleic Acids Research*, *44*(1), 286–293. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1248>
- Hyatt, D., Chen, G. L., LoCascio, P. F., Land, M. L., Larimer, F. W. & Hauser, L. J. (2010). Prodigal: Prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics*, *11*(5), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-119>
- International Energy and Agency (2018). *The Future of Petrochemicals. Towards more Sustainable Plastics and Fertilisers*. Paris: International Energy and Agency
- Isabel San-Martín, M., Mateos, R., Carracedo, B., Escapa, A. & Morán, A. (2018). Pilot-scale bioelectrochemical system for simultaneous nitrogen and carbon removal in urban wastewater treatment plants. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *126*(6), 758–763. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.06.008>

- Isipato, M., Dessì, P., Sánchez, C., Mills, S., Ijaz, U. Z., Asunis, F. *et al.* (2020). Propionate Production by Bioelectrochemically-Assisted Lactate Fermentation and Simultaneous CO₂ Recycling. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 3184. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.599438>
- Jang, Y. S., Kim, B., Shin, J. H., Choi, Y. J., Choi, S., Song, C. W. *et al.* (2012). Bio-based production of C₂-C₆ platform chemicals. *Biotechnology and Bioengineering*, *109*(10), 2437–2459. <https://doi.org/10.1002/bit.24599>
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B. Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L. *et al.* (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*, *10*(1), 1–11. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>
- Jones, R. J., Massanet-Nicolau, J., Mulder, M. J. J., Premier, G., Dinsdale, R. & Guwy, A. (2017). Increased biohydrogen yields, volatile fatty acid production and substrate utilisation rates via the electrodialysis of a continually fed sucrose fermenter. *Bioresource Technology*, *229*, 46–52. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.015>
- Jung, S. & Regan, J. M. (2007). Comparison of anode bacterial communities and performance in microbial fuel cells with different electron donors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *77*(2), 393–402. Springer. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1162-y>
- Jung, T. (2020). *Analysen zur Substrataufnahme und Produktbildung des elektroautotrophen Biokatalysators Kyrpidia spormannii*. Karlsruher Institut für Technologie (KIT). <https://doi.org/10.5445/IR/1000119364>
- Jung, T., Hackbarth, M., Horn, H. & Gescher, J. (2021). Improving the cathodic biofilm growth capabilities of *kyrpidia spormannii* EA-1 by undirected mutagenesis. *Microorganisms*, *9*(1), 1–15. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010077>
- Junge, C. E. & Werby, R. T. (1958). The Concentration of Chloride, Sodium, Potassium, Calcium and Sulfate in Rain Water over the United States. *Journal of Atmospheric Sciences*, *15*(5), 417–425. Boston MA, American Meteorological Society. [https://doi.org/10.1175/1520-0469\(1958\)015](https://doi.org/10.1175/1520-0469(1958)015)
- Kabbeck, T. (2019). *Charakterisierung und Anwendung einer Biofilmkultivierungsplattform*. Karlsruher Institut für Technologie (KIT). <https://doi.org/10.5445/IR/1000096259>
- Kamm, B. (2010). Integrated biorefineries—A bottom-up approach to biomass fractionation. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* (Band 66, S. 319–343). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-642-13440-1_12
- Kane, M. D. & Breznak, J. A. (1991). *Acetonema longum* gen.nov.sp.nov., an H₂/CO₂ acetogenic bacterium from the termite, *Pterotermes occidentis*. *Archives of Microbiology*, *156*(2), 91–98. Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/BF00290979>
- Kanehisa, M. & Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, *28*(1), 27–30. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>

- Kang, D. D., Froula, J., Egan, R. & Wang, Z. (2015). MetaBAT, an efficient tool for accurately reconstructing single genomes from complex microbial communities. *PeerJ*, 2015(8). PeerJ Inc. <https://doi.org/10.7717/peerj.1165>
- Kato, S. (2016). Microbial extracellular electron transfer and its relevance to iron corrosion. *Microbial Biotechnology*, 9(2), 141–148. John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12340>
- Kedia, G., Passanha, P., Dinsdale, R. M., Guwy, A. J. & Esteves, S. R. (2014). Evaluation of feeding regimes to enhance PHA production using acetic and butyric acids by a pure culture of *Cupriavidus necator*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 19(6), 989–995. Korean Society for Biotechnology and Bioengineering. <https://doi.org/10.1007/s12257-014-0144-z>
- Khanna, S. & Srivastava, A. K. (2005). Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstonia eutropha*. *Process Biochemistry*, 40(6), 2173–2182. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.08.011>
- Klessing, T. (2019). *Abreinigung cellulosehaltiger Biomasse unter Generierung elektrischer Energie und Acetoin*. Karlsruher Institut für Technologie (KIT). <http://doi.org/10.5445/IR/1000092085>
- Kokko, M., Epple, S., Gescher, J. & Kerzenmacher, S. (2018). Effects of wastewater constituents and operational conditions on the composition and dynamics of anodic microbial communities in bioelectrochemical systems. *Bioresource Technology*, 258, 376–389. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.090>
- Kolvenbach, B. A., Helbling, D. E., Kohler, H.-P. E. & Corvini, P. F. X. (2014). Emerging chemicals and the evolution of biodegradation capacities and pathways in bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 27, 8–14. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.08.017>
- Koskella, B. & Vos, M. (2015). Adaptation in Natural Microbial Populations. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 46, 503–522. Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-112414-054458>
- Kostritskii, A. Y., Tolmachev, D. A., Lukasheva, N. V. & Gurtovenko, A. A. (2017). Molecular-Level Insight into the Interaction of Phospholipid Bilayers with Cellulose. *Langmuir*, 33(44), 12793–12803. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b02297>
- Kowalczyk, A., Martin, T. J., Price, O. R., Snape, J. R., van Egmond, R. A., Finnegan, C. J. *et al.* (2015). Refinement of biodegradation tests methodologies and the proposed utility of new microbial ecology techniques. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 111, 9–22. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.09.021>
- Kracher, D., Scheiblbrandner, S., Felice, A. K. G., Breslmayr, E., Preims, M., Ludwicka, K. *et al.* (2016). Extracellular electron transfer systems fuel cellulose oxidative degradation. *Science*, 352(6289), 1098–1101. American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.aaf3165>

- Kremp, F., Roth, J. & Müller, V. (2020). The *Sporomusa* type Nfn is a novel type of electron-bifurcating transhydrogenase that links the redox pools in acetogenic bacteria. *Scientific Reports*, 10(1), 14872. Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71038-2>
- Krieg, T., Sydow, A., Schröder, U., Schrader, J. & Holtmann, D. (2014). Reactor concepts for bioelectrochemical syntheses and energy conversion. *Trends in Biotechnology*, 32(12), 645–655. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.10.004>
- Kumar, R., Singh, L. & Zularisam, A. W. (2016). Exoelectrogens: Recent advances in molecular drivers involved in extracellular electron transfer and strategies used to improve it for microbial fuel cell applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 56, 1322–1336. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.029>
- Kumar, R., Strezov, V., Weldekidan, H., He, J., Singh, S., Kan, T. *et al.* (2020). Lignocellulose biomass pyrolysis for bio-oil production: A review of biomass pre-treatment methods for production of drop-in fuels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 123, 109763. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.109763>
- Lam, C. M., Yu, I. K. M., Hsu, S. C. & Tsang, D. C. W. (2018). Life-cycle assessment on food waste valorisation to value-added products. *Journal of Cleaner Production*, 199, 840–848. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.07.199>
- Lee, C. Y., Reuillard, B., Sokol, K. P., Laftoglou, T., Lockwood, C. W. J., Rowe, S. F. *et al.* (2016). A decahaem cytochrome as an electron conduit in protein-enzyme redox processes. *Chemical Communications*, 52(46), 7390–7393. Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c6cc02721k>
- Li, D., Liu, C. M., Luo, R., Sadakane, K. & Lam, T. W. (2015). MEGAHIT: An ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics*, 31(10), 1674–1676. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv033>
- Lide D. R. (2010). CRC Handbook of Chemistry and physics on CD-ROM/ David R. Lide
- Van Lier, J. B., Grolle, K. C., Frijters, C. T., Stams, A. J. & Lettinga, G. (1993). Effects of acetate, propionate, and butyrate on the thermophilic anaerobic degradation of propionate by methanogenic sludge and defined cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(4).
- Lin, C. S. K., Pfaltzgraff, L. A., Herrero-Davila, L., Mubofu, E. B., Abderrahim, S., Clark, J. H. *et al.* (2013). Food waste as a valuable resource for the production of chemicals, materials and fuels. Current situation and global perspective. *Energy and Environmental Science*, 6(2), 426–464. Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c2ee23440h>
- Liu, J., Li, J., Shin, H. dong, Liu, L., Du, G. & Chen, J. (2017). Protein and metabolic engineering for the production of organic acids. *Bioresource Technology*, 239, 412–421. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.052>

- Liu, L., Zhu, Y., Li, J., Wang, M., Lee, P., Du, G. *et al.* (2012). Microbial production of propionic acid from propionibacteria: Current state, challenges and perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*, 32(4), 374–381. <https://doi.org/10.3109/07388551.2011.651428>
- Liu, W. feng & Cheng, S. an. (2014). Microbial fuel cells for energy production from wastewaters: the way toward practical application. *Journal of Zhejiang University: Science A*, 15(11), 841–861. Zhejiang University. <https://doi.org/10.1631/jzus.A1400277>
- Ljungdahl, L. G. (1969). Total synthesis of acetate from CO₂ by heterotrophic bacteria. *Annual review of microbiology*, 23, 515–538. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.23.100169.002503>
- 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. & Regan, J. M. (2006). Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. *Trends in Microbiology*, 14(12), 512–518. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.10.003>
- Logan, B. E., Wallack, M. J., Kim, K. Y., He, W., Feng, Y. & Saikaly, P. E. (2015). Assessment of Microbial Fuel Cell Configurations and Power Densities. *Environmental Science and Technology Letters*, 2(8), 206–214. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.5b00180>
- Lombardi, L. & Francini, G. (2020). Techno-economic and environmental assessment of the main biogas upgrading technologies. *Renewable Energy*, 156, 440–458. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.04.083>
- Lopes, M. S. G. (2015). Engineering biological systems toward a sustainable bioeconomy. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 42(6), 813–838. Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1606-9>
- Lovley, D. R., Ueki, T., Zhang, T., Malvankar, N. S., Shrestha, P. M., Flanagan, K. A. *et al.* (2011). *Geobacter*. The Microbe Electric's Physiology, Ecology, and Practical Applications. *Advances in Microbial Physiology* (Band 59, S. 1–100). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387661-4.00004-5>
- Lu, J., Brigham, C. J., Gai, C. S. & Sinskey, A. J. (2012). Studies on the production of branched-chain alcohols in engineered *Ralstonia eutropha*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(1), 283–297. Springer. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4320-9>
- Lu, L., Huggins, T., Jin, S., Zuo, Y. & Ren, Z. J. (2014). Microbial metabolism and community structure in response to bioelectrochemically enhanced remediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil. *Environmental Science and Technology*, 48(7), 4021–4029. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/es4057906>

- Luo, C., Rodriguez-R, L. M. & Konstantinidis, K. T. (2014). MyTaxa: An advanced taxonomic classifier for genomic and metagenomic sequences. *Nucleic Acids Research*, 42(8). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/nar/gku169>
- Lutz, R. & Bujard, H. (1997). Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. *Nucleic Acids Research*, 25(6), 1203–1210. *Nucleic Acids Res.* <https://doi.org/10.1093/nar/25.6.1203>
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H. & Pretorius, I. S. (2002). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 506–577. American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/membr.66.3.506-577.2002>
- Mahadevan, R., Bond, D. R., Butler, J. E., Esteve-Núñez, A., Coppi, M. V., Palsson, B. O. *et al.* (2006). Characterization of Metabolism in the Fe(III)-Reducing Organism *Geobacter sulfurreducens* by Constraint-Based Modeling. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(2), 1558–1568. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1558-1568.2006>
- Majewski, R. A. & Domach, M. M. (1990). Simple constrained-optimization view of acetate overflow in *E. coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 35(7), 732–738. *Biotechnol Bioeng.* <https://doi.org/10.1002/bit.260350711>
- Martin, J. (2011). Perspective: Don't foul the water. *Nature*, 474(7352 SUPPL.), 1–17. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/474S017a>
- Massana, R., Murray, A. E., Preston, C. M. & DeLong, E. F. (1997). Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic Archaea in the Santa Barbara Channel. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(1), 50–56. American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/aem.63.1.50-56.1997>
- May, H. D., Evans, P. J. & LaBelle, E. V. (2016). The bioelectrosynthesis of acetate. *Current Opinion in Biotechnology*, 42, 225–233. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.09.004>
- McCarty, P. L., Bae, J. & Kim, J. (2011). Domestic wastewater treatment as a net energy producer-can this be achieved? *Environmental Science and Technology*, 45(17), 7100–7106. UTC. <https://doi.org/10.1021/es2014264>
- Meer, J. R. van der. (2006). Environmental pollution promotes selection of microbial degradation pathways. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 4(1), 35–42. John Wiley & Sons, Ltd. [https://doi.org/10.1890/1540-9295\(2006\)004\[0035:EPPSOM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1540-9295(2006)004[0035:EPPSOM]2.0.CO;2)
- Mock, J., Wang, S., Huang, H., Kahnt, J. & Thauer, R. K. (2014). Evidence for a hexaheteromeric methylenetetrahydrofolate reductase in *Moorella thermoacetica*. *Journal of Bacteriology*, 196(18), 330–331. American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/JB.01839-14>

- Miyahara, M., Kouzuma, A. & Watanabe, K. (2015). Effects of NaCl concentration on anode microbes in microbial fuel cells. *AMB Express* 5(1), Springer Verlag. American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0123-6>
- Mohanakrishna, G., Abu-Reesh, I. M. & Pant, D. (2020). Enhanced bioelectrochemical treatment of petroleum refinery wastewater with Labanah whey as co-substrate. *Scientific Reports*, 10(1), 1–11. Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76668-0>
- Mollaei, M., Timmers, P. H. A., Suarez-Diez, M., Boeren, S., Gelder, A. H., Stams, A. J. M. *et al.* (2021). Comparative proteomics of *Geobacter sulfurreducens* PCA^T in response to acetate, formate and/or hydrogen as electron donor. *Environmental Microbiology*, 23(1), 299–315. Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15311>
- Möller, B., Oßmer, R., Howard, B. H., Gottschalk, G. & Hippe, H. (1984). *Sporomusa*, a new genus of gram-negative anaerobic bacteria including *Sporomusa sphaeroides* spec. nov. and *Sporomusa ovata* spec. nov. *Archives of Microbiology*, 139(4), 388–396. Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/BF00408385>
- Müller, N., Worm, P., Schink, B., Stams, A. J. M. & Plugge, C. M. (2010). Syntrophic butyrate and propionate oxidation processes: From genomes to reaction mechanisms. *Environmental Microbiology Reports*, 2(4), 489–499. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00147.x>
- Nangle, S. N., Ziesack, M., Buckley, S., Trivedi, D., Loh, D. M., Nocera, D. G. *et al.* (2020). Valorization of CO₂ through lithoautotrophic production of sustainable chemicals in *Cupriavidus necator*. *Metabolic Engineering*, 62, 207–220. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2020.09.002>
- Natural Renewable Energy Lab.* (2009). <https://www.nrel.gov/biomass/biorefinery.html>
- 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), 2882–2886. *Appl Environ Microbiol.* <https://doi.org/10.1128/AEM.02642-10>
- Nevin, K. P., Holmes, D. E., Woodard, T. L., Hinlein, E. S., Ostendorf, D. W. & Lovley, D. R. (2005). *Geobacter bemidjiensis* sp. nov. and *Geobacter psychrophilus* sp. nov., two novel Fe(III)-reducing subsurface isolates. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(4), 1667–1674. *Int J Syst Evol Microbiol.* <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63417-0>
- 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). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/mBio.00103-10>
- NXTGEN Reports. (2018). *Global Acetoin Market 2018-2023*. <https://www.nxtgenreports.com/market-research-reports/global-acetoin-cas-513-86-0-market-2018-2023>

- Outram, V. & Zhang, Y. (2018). Solvent-free membrane extraction of volatile fatty acids from acidogenic fermentation. *Bioresource Technology*, 270, 400–408. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.057>
- Overhage, J., Steinbüchel, A. & Priefert, H. (2002). Biotransformation of eugenol to ferulic acid by a recombinant strain of *Cupriavidus necator* H16. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4315–4321. Appl Environ Microbiol. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4315-4321.2002>
- Pachapur, V. L., Sarma, S. J., Brar, S. K. & Chaabouni, E. (2016). Platform Chemicals. *Platform Chemical Biorefinery* (S. 1–20). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802980-0.00001-8>
- Parks, D. H., Imelfort, M., Skennerton, C. T., Hugenholtz, P. & Tyson, G. W. (2015). CheckM: Assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Research*, 25(7), 1043–1055. Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/gr.186072.114>
- Patel, S. S. & Rosenthal, K. S. (2007). Microbial Adaptation - Putting the Best Team on the Field. *Infectious Diseases in Clinical Practice*, 15(5), 330–334. <https://doi.org/10.1097/IPC.0b013e31814b1b47>
- Patil, S. A., Harnisch, F., Koch, C., Hübschmann, T., Fetzer, I., Carmona-Martínez, A. A. *et al.* (2011). Electroactive mixed culture derived biofilms in microbial bioelectrochemical systems: The role of pH on biofilm formation, performance and composition. *Bioresource Technology*, 102(20), 9683–9690. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.087>
- Pavlostathis, S. G. & Gossett, J. M. (1986). A kinetic model for anaerobic digestion of biological sludge. *Biotechnology and Bioengineering*, 28(10), 1519–1530. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/bit.260281010>
- Pfaender, F. K., Shimp, R. J. & Larson, R. J. (1985). Adaptation of estuarine ecosystems to the biodegradation of nitrilotriacetic acid: Effects of preexposure. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 4(5), 587–593. <https://doi.org/10.1002/etc.5620040502>
- Pham, H. T., Boon, N., Aeltermann, P., Clauwaert, P., De Schampelaire, L., Van Oostveldt, P. *et al.* (2008). High shear enrichment improves the performance of the anodophilic microbial consortium in a microbial fuel cell. *Microbial Biotechnology*, 1(6), 487–496. Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2008.00049.x>
- 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>
- Pleissner, D. & Lin, C. S. K. (2013). Valorisation of food waste in biotechnological processes. *Sustainable Chemical Processes*, 1(1), 21. Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1186/2043-7129-1-21>

- Poehlein, A., Schmidt, S., Kaster, A.-K., Goenrich, M., Vollmers, J., Thürmer, A. *et al.* (2012). An Ancient Pathway Combining Carbon Dioxide Fixation with the Generation and Utilization of a Sodium Ion Gradient for ATP Synthesis. *PLoS ONE*, 7(3), 334–349. Public Library of Science. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033439>
- Pohlmann, A., Fricke, W. F., Reinecke, F., Kusian, B., Liesegang, H., Cramm, R. *et al.* (2006). Genome sequence of the bioplastic-producing „Knallgas“ bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nature Biotechnology*, 24(10), 1257–1262. <https://doi.org/10.1038/nbt1244>
- Potter, M. C. (1911). Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 84(571), 260–276. The Royal Society. <https://doi.org/10.1098/rspb.1911.0073>
- Pu, Y., Hu, F., Huang, F., Davison, B. H. & Ragauskas, A. J. (2013). Assessing the molecular structure basis for biomass recalcitrance during dilute acid and hydrothermal pretreatments. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 15. BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-15>
- Pyrgakis, K. A. & Kokossis, A. C. (2019). A Total Site Synthesis approach for the selection, integration and planning of multiple-feedstock biorefineries. *Computers and Chemical Engineering*, 122, 26–55. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2018.09.003>
- Quan, X. chun, Quan, Y. ping & Tao, K. (2012). Effect of anode aeration on the performance and microbial community of an air-cathode microbial fuel cell. *Chemical Engineering Journal*, 210, 150–156. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.09.009>
- Quinlan, A. R. & Hall, I. M. (2010). BEDTools: A flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics*, 26(6), 841–842. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033>
- Rabaey, K., Clauwaert, P., Aelterman, P. & Verstraete, W. (2005). Tubular microbial fuel cells for efficient electricity generation. *Environmental Science and Technology*, 39(20), 8077–8082. Environ Sci Technol. <https://doi.org/10.1021/es050986i>
- Rabaey, K., Rodríguez, J., Blackall, L. L., Keller, J., Gross, P., Batstone, D. *et al.* (2007). Microbial ecology meets electrochemistry: Electricity-driven and driving communities. *ISME Journal*, 1(1), 9–18. ISME J. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.4>
- Rabaey, K. & Rozendal, R. A. (2010). Microbial electrosynthesis - Revisiting the electrical route for microbial production. *Nature Reviews Microbiology*, 8(10), 706–716. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2422>
- Rabaey, K. & Verstraete, W. (2005). Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. *Trends in Biotechnology*, 23(6), 291–298. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.04.008>

- Raberg, M., Volodina, E., Lin, K. & Steinbüchel, A. (2018). *Ralstonia eutropha* H16 in progress: Applications beside PHAs and establishment as production platform by advanced genetic tools. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(4), 494–510. Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1369933>
- Ragsdale, S. W. (1997). The Eastern and Western branches of the Wood/Ljungdahl pathway: How the East and West were won. *BioFactors*, 6(1), 3–11. Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1002/biof.5520060102>
- Rainey, F. A., Fritze, D. & Stackebrandt, E. (1994). The phylogenetic diversity of thermophilic members of the genus *Bacillus* as revealed by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 115(2–3), 205–211. Oxford Academic. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb06639.x>
- Rebecchi, S., Pinelli, D., Bertin, L., Zama, F., Fava, F. & Frascari, D. (2016). Volatile fatty acids recovery from the effluent of an acidogenic digestion process fed with grape pomace by adsorption on ion exchange resins. *Chemical Engineering Journal*, 306, 629–639. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.07.101>
- Rehnlund, D., Klein, E., Edel, M., Weiler, J., Lim, G., Sturm-Richter, K. *et al.* (2020). Bioelectrochemical Microfluidic Platform for Cultivation and Integrated Characterization of Exoelectrogenic Biofilms. *ECS Meeting Abstracts*, MA2020-01(47), 2692–2692. The Electrochemical Society. <https://doi.org/10.1149/ma2020-01472692mtgabs>
- Reiner, J. E. (2020). *Untersuchungen zur Nutzung von Knallgasbakterien als Biokatalysator in einem aeroben Elektrosyntheseprozess zur stofflichen Nutzung von CO₂*. Karlsruhe Institut für Technologie (KIT). <https://doi.org/10.5445/IR/1000105148>
- Reiner, J. E., Geiger, K., Hackbarth, M., Fink, M., Lapp, C. J., Jung, T. *et al.* (2020). From an extremophilic community to an electroautotrophic production strain: identifying a novel Knallgas bacterium as cathodic biofilm biocatalyst. *ISME Journal*, 14(5), 1125–1140. Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0595-5>
- Resch, G., Held, A., Faber, T., Panzer, C., Toro, F. & Haas, R. (2008). Potentials and prospects for renewable energies at global scale. *Energy Policy*, 36(11), 4048–4056. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2008.06.029>
- Research, G. V. (2015). *Propionic acid market size, share & trends analysis report by application (animal feed & grain preservatives, food preservatives, herbicides, chemicals & pharmaceuticals), and segment forecasts, 2014 – 2025*, Industry Report.
- Research, G. V. (2020). *Acetic acid market size, share & trends analysis report by application (vinyl acetate monomer, purified terephthalic acid, acetate esters, ethanol), by region, and segment forecasts, 2020 – 2027*, Industry Report.
- Richter, H., Lanthier, M., Nevin, K. P. & Lovley, D. R. (2007). Lack of electricity production by *Pelobacter carbinolicus* indicates that the capacity for Fe(III) oxide reduction does not necessarily confer electron transfer ability to fuel cell anodes. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), 5347–5353. <https://doi.org/10.1128/AEM.00804-07>

- Richter, K., Schicklberger, M. & Gescher, J. (2012). Dissimilatory reduction of extracellular electron acceptors in anaerobic respiration. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(4), 913–921. <https://doi.org/10.1128/AEM.06803-11>
- Roe, A. J., McLaggan, D., Davidson, I., O’Byrne, C. & Booth, I. R. (1998). Perturbation of anion balance during inhibition of growth of *Escherichia coli* by weak acids. *Journal of Bacteriology*, 180(4), 767–772. American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/jb.180.4.767-772.1998>
- Roe, A. J., O’Byrne, C., McLaggan, D. & Booth, I. R. (2002). Inhibition of *Escherichia coli* growth by acetic acid: A problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity. *Microbiology*, 148(7), 2215–2222. Society for General Microbiology. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-7-2215>
- Röling, W. F. M. (2014). The family *Geobacteraceae*. *The Prokaryotes: Deltaproteobacteria and Epsilonproteobacteria* (Band 9, S. 157–172). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-39044-9_381
- Roller, S. D., Bennetto, H. P., Delaney, G. M., Mason, J. R., Stirling, J. L. & Thurston, C. F. (2008). Electron-transfer coupling in microbial fuel cells: comparison of redox-mediator reduction rates and respiratory rates of bacteria. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology. Biotechnology*, 34(1), 3–12. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/jctb.280340103>
- Rotaru, A. E., Shrestha, P. M., Liu, F., Markovaite, B., Chen, S., Nevin, K. P. *et al.* (2014). Direct interspecies electron transfer between *Geobacter metallireducens* and *Methanosarcina barkeri*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(15), 4599–4605. American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/AEM.00895-14>
- Rozendal, René A, Hamelers, H. V. M., Rabaey, K., Keller, J. & Buisman, C. J. N. (2008). Towards practical implementation of bioelectrochemical wastewater treatment. *Trends in Biotechnology*, 26(8), 450–459. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.04.008>
- Rozendal, René A., Hamelers, H. V. M., Rabaey, K., Keller, J. & Buisman, C. J. N. (2008). Towards practical implementation of bioelectrochemical wastewater treatment. *Trends in Biotechnology*, 26(8), 450–459. Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.04.008>
- 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>
- Salmond, C. V., Kroll, R. G. & Booth, I. R. (1984). The effect of food preservatives on pH homeostasis in *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology*, 130(11), 2845–2850. J Gen Microbiol. <https://doi.org/10.1099/00221287-130-11-2845>
- San-Martín, M. I., Leicester, D. D., Heidrich, E. S., Alonso, R. M., Mateos, R. & Escapa, A. (2018). Bioelectrochemical Systems for Energy Valorization of Waste Streams. *Energy Systems and Environment*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.74039>

- Sanna, A., Uibu, M., Caramanna, G., Kuusik, R. & Maroto-Valer, M. M. (2014). A review of mineral carbonation technologies to sequester CO₂. *Chemical Society Reviews*, 43(23), 8049–8080. Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c4cs00035h>
- Santos, J. B. C., de Barros, V. V. S. & Linares, J. J. (2017). The Hydraulic Retention Time as a Key Parameter for the Performance of a Cyclically Fed Glycerol-Based Microbial Fuel Cell from Biodiesel. *Journal of The Electrochemical Society*, 164(3), 3001–3006. The Electrochemical Society. <https://doi.org/10.1149/2.0011703jes>
- Schievano, A., Pepé Sciarria, T., Vanbroekhoven, K., De Wever, H., Puig, S., Andersen, S. J. *et al.* (2016). Electro-Fermentation – Merging Electrochemistry with Fermentation in Industrial Applications. *Trends in Biotechnology*, 34(11), 866–878. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.04.007>
- Schmidt, A., Sturm, G., Lapp, C. J., Siebert, D., Saravia, F., Horn, H. *et al.* (2018). Development of a production chain from vegetable biowaste to platform chemicals. *Microbial Cell Factories*, 17(1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0937-4>
- Schmieder, R. & Edwards, R. (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*, 27(6), 863–864. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr026>
- Schröder, U., Harnisch, F. & Angenent, L. T. (2015). Microbial electrochemistry and technology: terminology and classification. *Energy & Environmental Science*, 8(2), 513–519. Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/C4EE03359K>
- 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. American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/AEM.01834-09>
- Seemann, T. (2014). Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068–2069. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
- Sieber, C. M. K., Probst, A. J., Sharrar, A., Thomas, B. C., Hess, M., Tringe, S. G. *et al.* (2018). Recovery of genomes from metagenomes via a dereplication, aggregation and scoring strategy. *Nature Microbiology*, 3(7), 836–843. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0171-1>
- Siegert, M., Li, X.-F., Yates, M. D. & Logan, B. E. (2015). The presence of hydrogenotrophic methanogens in the inoculum improves methane gas production in microbial electrolysis cells. *Frontiers in Microbiology*, 5(DEC), 778. Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00778>
- Sluutels, T. H. J. A., Lodder, R., Hamelers, H. V. M. & Buisman, C. J. N. (2009). Improved performance of porous bio-anodes in microbial electrolysis cells by enhancing mass and charge transport. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(24), 9655–9661. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.09.089>

- Song, T. S., Wu, X. Y. & Zhou, C. C. (2014). Effect of different acclimation methods on the performance of microbial fuel cells using phenol as substrate. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(2), 133–138. Springer. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-0975-6>
- Åsa Stenmarck & Carl Jensen (2016). *Estimates of European food waste levels*. Stockholm, Sweden. [https://www.eu-fusions.org/phocadownload/Publications/Estimates of European food waste levels.pdf](https://www.eu-fusions.org/phocadownload/Publications/Estimates%20of%20European%20food%20waste%20levels.pdf)
- Stubba, D., Lahm, G., Geffe, M., Runyon, J. W., Arduengo, A. J. & Opatz, T. (2015). Xylochemistry - Making Natural Products Entirely from Wood. *Angewandte Chemie - International Edition*, 54(47), 14187–14189. Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/anie.201508500>
- 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. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.116>
- Sturm, G., Dolch, K., Richter, K., Rautenberg, M. & Gescher, J. (2012). Metal reducers and reduction targets. A short survey about the distribution of dissimilatory metal reducers and the multitude of terminal electron acceptors. *Microbial Metal Respiration: From Geochemistry to Potential Applications* (Band 1, S. 129–159). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-32867-1_6
- Sun, Z. & Barta, K. (2018). Cleave and couple: toward fully sustainable catalytic conversion of lignocellulose to value added building blocks and fuels. *Chemical Communications*, 54(56), 7725–7745. Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/C8CC02937G>
- Sun, Z., Li, M., Qi, Q., Gao, C. & Lin, C. S. K. (2014). Mixed Food Waste as Renewable Feedstock in Succinic Acid Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174(5), 1822–1833. Humana Press Inc. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1169-7>
- Szenk, M., Dill, K. A. & de Graff, A. M. R. (2017). Why Do Fast-Growing Bacteria Enter Overflow Metabolism? Testing the Membrane Real Estate Hypothesis. *Cell Systems*, 5(2), 95–104. Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2017.06.005>
- Taherzadeh, M. & Karimi, K. (2008). Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(9), 1621–1651. Molecular Diversity Preservation International. <https://doi.org/10.3390/ijms9091621>
- Tamagnini, P., Axelsson, R., Lindberg, P., Oxelfelt, F., Wünschiers, R. & Lindblad, P. (2002). Hydrogenases and Hydrogen Metabolism of Cyanobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(1), 1–20. American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/mnbr.66.1.1-20.2002>
- Tamames, J. & Puente-Sánchez, F. (2019). SqueezeMeta, A Highly Portable, Fully Automatic Metagenomic Analysis Pipeline. *Frontiers in Microbiology*, 9(1), 3349. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03349>

- Tradler, S. B., Mayr, S., Himmelsbach, M., Priewasser, R., Baumgartner, W. & Stadler, A. T. (2018). Hydrothermal carbonization as an all-inclusive process for food-waste conversion. *Bioresource Technology Reports*, 2, 77–83. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2018.04.009>
- Thauer, R. K., Jungermann, K. & Decker, K. (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological Reviews*, 41(1), 100–180. American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/br.41.1.100-180>.
- Treangen, T. J., Sommer, D. D., Angly, F. E., Koren, S. & Pop, M. (2011). Next generation sequence assembly with AMOS. *Current Protocols in Bioinformatics*, (SUPP.33), 1–18. John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1108s33>
- Tremblay, P. L. & Zhang, T. (2015). Electrifying microbes for the production of chemicals. *Frontiers in Microbiology*, 6(3), 192–201. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00201>
- Tuck, C. O., Pérez, E., Horváth, I. T., Sheldon, R. A. & Poliakoff, M. (2012). Valorization of biomass: Deriving more value from waste. *Science*. American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.1218930>
- UNEP (2019). *Global Chemicals Outlook II From legacies to innovative solutions: Implementing the 2030 Agenda for Sustainable Development, United Nations Environmental Programme*. ANairobi: UNEP
- Vavouraki, A. I., Angelis, E. M. & Kornaros, M. (2013). Optimization of thermo-chemical hydrolysis of kitchen wastes. *Waste Management*, 33(3), 740–745. Waste Manag. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2012.07.012>
- Vemuri, G. N., Altman, E., Sangurdekar, D. P., Khodursky, A. B. & Eiteman, M. A. (2006). Overflow metabolism in *Escherichia coli* during steady-state growth: Transcriptional regulation and effect of the redox ratio. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3653–3661. American Society for Microbiology (ASM). <https://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3653-3661.2006>
- Venkata Mohan, S., Rohit, M. V., Chiranjeevi, P., Chandra, R. & Navaneeth, B. (2015). Heterotrophic microalgae cultivation to synergize biodiesel production with waste remediation: Progress and perspectives. *Bioresource Technology*, 184, 169–178. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.056>
- Venkateswaran, K., Moser, D. P., Dollhopf, M. E., Lies, D. P., Saffarini, D. A., MacGregor, B. J. *et al.* (1999). Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(2), 705–724. Society for General Microbiology. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-2-705>
- Verma, N. & Bhardwaj, A. (2015). Biosensor Technology for Pesticides—A review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(6), 3093–3119. Humana Press Inc. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1489-2>

- Wagner, T., Koch, J., Ermler, U. & Shima, S. (2017). Methanogenic heterodisulfide reductase (HdrABC-MvhAGD) uses two noncubane [4Fe-4S] clusters for reduction. *Science*, 357(6352), 699–703. American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.aan0425>
- Wang, C. & Qi, C. (2013). Mechanistic insights into N- or P-centered nucleophile promoted thiol–vinylsulfone Michael addition. *Tetrahedron*, 69(26), 5348–5354. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2013.04.123>
- 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, J. & Wan, W. (2009). Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(2), 799–811. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.11.015>
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M. & Cole, J. R. (2007). Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), 5261–5267. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>
- Weber, K. A., Achenbach, L. A. & Coates, J. D. (2006). Microorganisms pumping iron: Anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nature Reviews Microbiology*, 4(10), 752–764. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1490>
- Werpy, T. & Petersen, G. (2004). Top Value Added Chemicals from Biomass. *U.S. Department of energy*, 1, 76. <https://doi.org/10.2172/926125>
- Willems, A. (2014). The family *Comamonadaceae*. *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria* (Band 9, S. 777–851). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1_238
- Windhorst, C. (2019). *Produktion von Plattformchemikalien auf Zucker- und CO₂-Basis mit dem Knallgasbakterium Cupriavidus necator H16*. Karlsruher Instituts für Technologie (KIT). <https://doi.org/10.5445/IR/1000098924>
- Windhorst, C. & Gescher, J. (2019). Biotechnology for Biofuels Efficient biochemical production of acetoin from carbon dioxide using *Cupriavidus necator*. *Biotechnology for Biofuels*, 5, 1–11. BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1512-x>
- Wong, H. L., White, R. A., Visscher, P. T., Charlesworth, J. C., Vázquez-Campos, X. & Burns, B. P. (2018). Disentangling the drivers of functional complexity at the metagenomic level in Shark Bay microbial mat microbiomes. *ISME Journal*, 12(11), 2619–2639. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0208-8>
- Wong, S. S., Shu, R., Zhang, J., Liu, H. & Yan, N. (2020). Downstream processing of lignin derived feedstock into end products. *Chemical Society Reviews*, 49(15), 5510–5560. Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/d0cs00134a>

- Wong, Y. M., Wu, T. Y. & Juan, J. C. (2014). A review of sustainable hydrogen production using seed sludge via dark fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 34, 471–482. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.03.008>
- Wu, Y. W., Simmons, B. A. & Singer, S. W. (2016). MaxBin 2.0: An automated binning algorithm to recover genomes from multiple metagenomic datasets. *Bioinformatics*, 32(4), 605–607. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv638>
- Xiong, X., Yu, I. K. M., Tsang, D. C. W., Bolan, N. S., Sik Ok, Y., Igalavithana, A. D. *et al.* (2019). Value-added chemicals from food supply chain wastes: State-of-the-art review and future prospects. *Chemical Engineering Journal*, 375, 1–21. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.121983>
- Yang, Y., Xu, M., Guo, J. & Sun, G. (2012). Bacterial extracellular electron transfer in bioelectrochemical systems. *Process Biochemistry*, 47(12), 1707–1714. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.07.032>
- Yasri, N., Roberts, E. P. L. & Gunasekaran, S. (2019). The electrochemical perspective of bioelectrocatalytic activities in microbial electrolysis and microbial fuel cells. *Energy Reports*, 5, 1116–1136. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.egy.2019.08.007>
- Yokoyama, H., Ohmori, H., Ishida, M., Waki, M. & Tanaka, Y. (2006). Treatment of cow-waste slurry by a microbial fuel cell and the properties of the treated slurry as a liquid manure. *Animal Science Journal*, 77(6), 634–638. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2006.00395.x>
- Yuan, Z., Liu, B., Zhou, P., Zhang, Z. & Chi, Q. (2018). Aerobic oxidation of biomass-derived 5-hydroxymethylfurfural to 2,5-diformylfuran with cesium-doped manganese dioxide. *Catalysis Science and Technology*, 8(17), 4430–4439. Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c8cy01246f>
- Zhu, X., Siegert, M., Yates, M. D. & Logan, B. E. (2015). Alamethicin suppresses methanogenesis and promotes acetogenesis in bioelectrochemical systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(11), 3863–3868. American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/AEM.00594-15>
- Zhuang, K., Vemuri, G. N. & Mahadevan, R. (2011). Economics of membrane occupancy and respiro-fermentation. *Molecular Systems Biology*, 7(1), 500. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.34>
- Zou, L., Qiao, Y. & Li, C. M. (2018). Boosting Microbial Electrocatalytic Kinetics for High Power Density: Insights into Synthetic Biology and Advanced Nanoscience. *Electrochemical Energy Reviews*, 1(4), 567–598. Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1007/s41918-018-0020-1>
- Zuo, Y., Maness, P. C. & Logan, B. E. (2006). Electricity production from steam-exploded corn stover biomass. *Energy and Fuels*, 20(4), 1716–1721. <https://doi.org/10.1021/ef0600331>

Zou, Y., Xing, D., Regan, J. M. & Logan, B. E. (2008). Isolation of the exoelectrogenic bacterium *Ochrobactrum anthropi* YZ-1 by using a U-tube microbial fuel cell. Applied and Environmental Microbiology, 74(10), 3130–3137. <https://doi.org/10.1128/AEM.02732-07>

Anhang

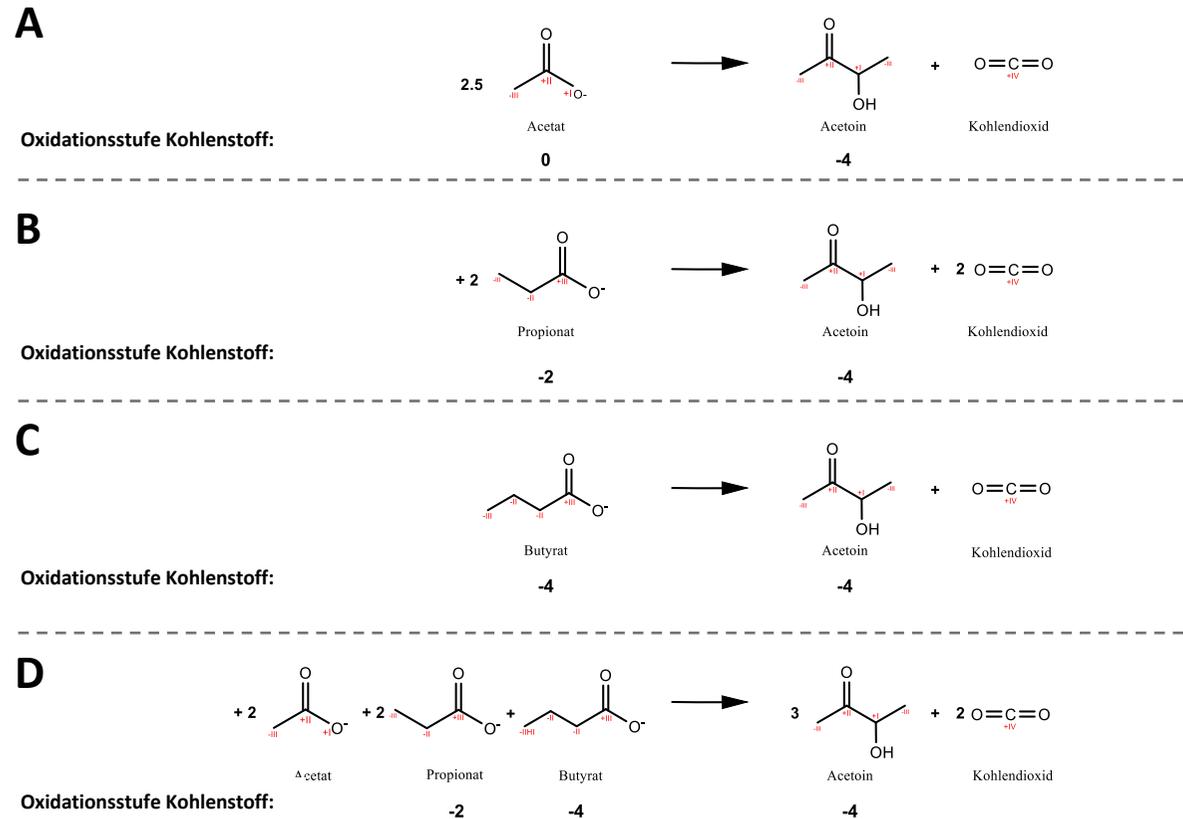


Abb. 27: Summenformel für die heterotrophe Acetoin-Produktion unter Bereitstellung von A) Acetat, B) Propionat, C) Butyrat und D) Einzelmischung.

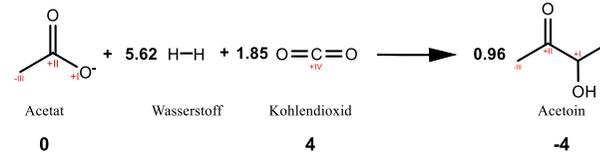
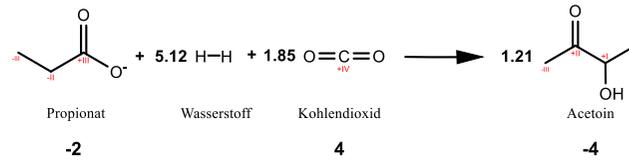
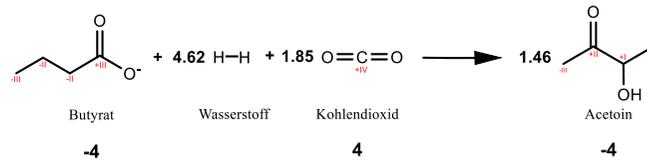
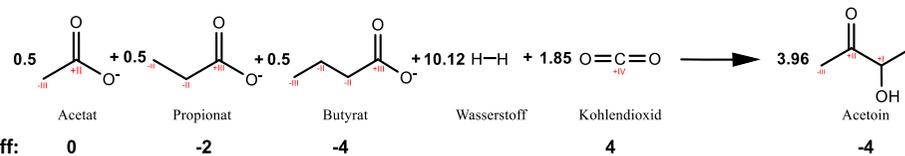
A**Oxidationsstufe Kohlenstoff:****B****Oxidationsstufe Kohlenstoff:****C****Oxidationsstufe Kohlenstoff:****D****Oxidationsstufe Kohlenstoff:**

Abb. 28: Summenformel für die mixotrophe Acetoin-Produktion aus A) Acetat, B) Propionat, C) Butyrat und D) einer 1:1:1-Mischung der drei Säuren. Die theoretische Berechnung basiert auf einer Headspace-Konzentration von 5 % bzw. 85 % von CO₂ und H₂.

Vollständige Daten zu Abb. 14

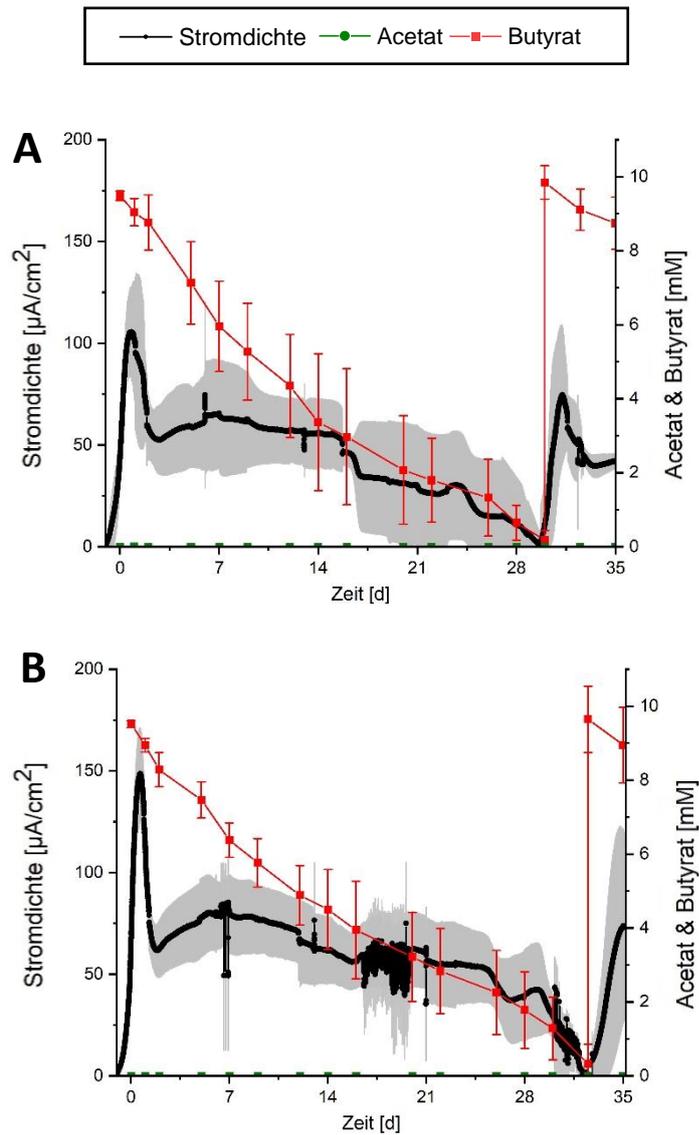


Abb. 29: Untersuchung der exoelektrogener butyrat-oxidierender Mikroorganismen unter Zugabe von *G. sulfurreducens*. Dargestellt ist der Stromdichtenverläufe (linke y-Achse) und die Acetat-/Butyrat-Konzentrationen (rechte y-Achse,) für A) ohne die Zugabe und B) mit der Zugabe von *G. sulfurreducens*. Die Untersuchung erfolgte unter Verwendung von Butyrat-Medium, bei einem Potential von 0 mV vs. SHE, 30 °C und konstanter N_2/CO_2 -Begasung in den Systemen nach Golitsch, 2016 im biologischen Triplikate.

Prozessstrategie Durchflussadaptation ohne eine automatisierten pH-Kontrolle

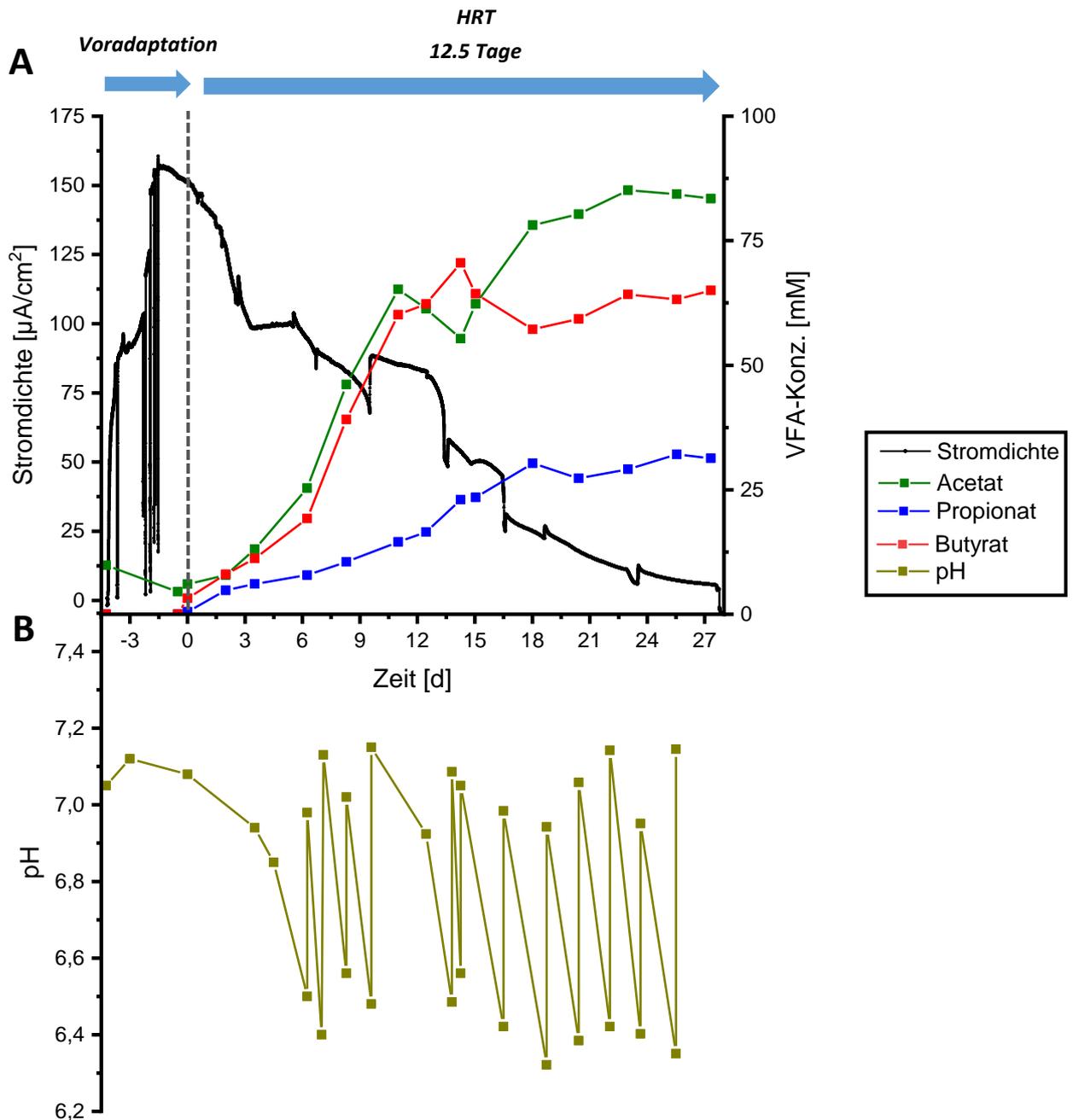


Abb. 30: Bioelektrochemische Adaptation von *G. sulfurreducens* an Hydrolyseflüssigkeit im System nach Golitsch, 2016. Dargestellt ist der A) Stromdichtenverlauf (linke Y-Achse, $\mu\text{A}/\text{cm}^2$) und die VFA-Konzentration (rechte Y-Achse, mM). Die Abgrenzung der Prozessphase ist durch die gestrichelte Linie gekennzeichnet. B) diese Abbildung zeigt den pH-Wert über die Zeit und die regelmäßige Titration mit 1 M NaOH. Die temporär auftretenden Stromdichtenspitzen bzw. Schwankungen sind auf die pH-Anpassung zurückzuführen. Die Untersuchung wurde bei einem Potential von 0 mV vs. SHE, 30 °C und konstanter N_2/CO_2 -Begasung durchgeführt.

Tab. 23: BLAST-Analyse der isolierten 16S-rDNA-Gensequenzen für die *Geobacter*-Gattung. Gezeigt sind lediglich die ersten vier Treffer.

Organismus	Query Cover	e-value	Identity
<i>Geobacter bemidjinesis</i> sp.	99 %	0,0	99,75 %
<i>Geobacter bemidjinesis</i> sp.	99 %	0,0	99,73 %
<i>Geobacter bremensis</i> strain DFr1	95 %	0,0	98,21 %
<i>Geobacter</i> sp. M21	94 %	0,0	97,58 %

16S-rDNA-Sequenz *Geobacter*-Isolat

AAAAGGAGGTGATCCAGCCGAGGTTCCCCTACGGCTACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTCACCG
GCCATTCCCTTAGGACGCTGCCTCCCTTGCGGGTTAGCTCACGCACTTCGGGACCAACCGACTCCCCT
GGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGCGATTAC
TAGCGATTCCAACCTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGAACTGAGACCGGCTTTTTGAGA
TTGGCTCCACCTCGCGGTATCGCTGCTCTTGTACCGGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGACA
TAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCGGTTTTGACACCGGCAGTCTCCTTAGA
GTGCCCAACTAAATGATGGCAACTAAGGATAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATC
TCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTTGC GGCTCCCGAAGGCACTCCCTACTT
TCGAAGGGATTCCGCAGATGTCAAGCCCAGGTAAGGTTCTGCGCGTTGCGTCGAATTAACCCACAT
GCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGTCTTGCAGCCGACTTCCCAGG
CGGAGAACTTAATGCGTTAGCTGCGGCACTGCAGGGGTCAATACCCGCAACACCTAGTTCTCATCG
TTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCGTCTCAGCGTCAA
TATCGGTCCAGGTAGCCGCCTTCGCCACCGGTGTTCCCTCCTAATATCTACGGATTTCACTCCTACAC
TAGGAATTCCACTACCCTCTCCCGTATTCAAGTCTCCCAGTATCCAATGCACTTCCTGGGTGAGCC
CAGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTACACGCGCTTACGCCAATAAATCCGAACAAC
GCTTGCACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCCTTTGTAGGTACCG
TCAAGAAAAACGGGTATTAACCGTTTTCAATTTCTCCCTACTGACAGAGCTTACGACCCGAAAGC
CTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTGCGTCAGGGTTTCCCCCATTGCGCAAAAATCCCCACTGCTGCC
TCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTAACCA
TCGTCGCCTTGGTGGGCCATTACCCACCAACTAGCTAATGGTACGCGGACCCATCCTGATACGGT
AGCTTATAAATAGAGGCCACCTTTTCTGCAGAGACCGAAGGCTCCGTAGGCTTATCCGGTATTAG
CACCCCTTTCGAGATGTTATTCCAGATAACAGGGCAGGTTATCCACGCGTTACTACCCGTGCGCCA
CTCTCACCAGAGCAAGCTCTGGATCCCGTTCGACTTGCATGTGTTAAGCACGCCGCCAGCGTTCGTT
CTGAGCCAGGATCAAACCTCTCCAG

Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Betreuer Johannes Gescher für das geschenkte Vertrauen danken, dass du mir mit der Überlassung dieses Themas übergeben hast. Danke, dass ich ein Teil deines großartigen Arbeitsumfeldes sein durfte und du mich immer mit deinem Enthusiasmus, deiner Energie und Geduld motiviert und inspiriert hast!

Liebe Arbeitsgruppe, vielen Dank, dass ich ein Teil dieser großartigen Gruppe mit vielen witzigen Momenten werden durfte und ich mich immer auf eure Unterstützung verlassen konnte. Auch all meinen Praktikanten, Studenten und Hiwis gilt ein Dank für ihre tatkräftige Unterstützung, die erst manche Kapitel dieser Arbeit ermöglichten. Meinen Kooperationspartnern danke ich für die gute Zusammenarbeit, die Bereitstellung von Materialien und für die wertvollen Diskussionen.

Insbesondere möchte ich Nicola und Thea danken. Ihr habt mir erst die praktische Welt der Mikrobiologie nähergebracht und mich von Beginn an methodisch, analytisch und technisch unterstützt. Vielen Dank für euren unermüdlich Einsatz, um mir das zu geben, was es zum Überleben in der Mikrobiologie und Elektrochemie braucht!

Vielen Dank Ferdi für die witzigen Momente und deine schier unendliche Feuerzeugsammlung, die mir so oft das „spontane“ sterile Arbeiten ermöglichte. Vielen Dank Anne für deinen unschätzbaren Rat und für die Kaffeepausen zwischendurch. Vielen Dank Ebi für deine erfrischende Art und die geteilte Begeisterung für die Brandmatt. Ein großes Dankeschön geht an Lucas für die Einführung in die Welt des frisch gemahlten Kaffees und die manchmal nicht-enden-wollenden Diskussion. Ich danke euch auch für die Korrektur-Marathons, die so manche Unebenheiten glätteten. Vielen Dank Ahmed für deine experimentelle Unterstützung, deinen Humor und die geteilte Faszination für exoelektrogenen Mischkulturen.

Ein besonderer Dank gilt auch meinen Freunden, die mir so oft durch ihre Unterstützung und ihr Verständnis, die Balance zurückgaben. Heinz-Peter und Erika, danke für die kleinen und großen aufbauenden Momente und dafür, dass eure Tür für mich immer offen ist. Lieber Brian, danke für die leuchtende Ananas, die seither meinen Flur im Licht erstrahlen lässt, die ausufernden Tiefschnee-Wanderungen und die großartige Freundschaft. Vielen Dank Björn für die unzähligen Spaziergänge um den *Eichkönig* und die Nacht-und-Nebel-Umbauten, die so oft Zucker für das Gemüt im richtigen Moment waren.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei denjenigen bedanken, die mir das alles überhaupt ermöglicht haben. Danke Mama für deine Unterstützung bei all meinen Entscheidungen. Ich danke auch all denen, die nicht mehr an der Abgabe dieser Arbeit teilnehmen können, mich jedoch auf dem Weg dahin in jeglicher Form unterstützten.