

**Verbesserung der Produktivität von *Shewanella oneidensis* in  
bioelektrochemischen Systemen durch erhöhte Biofilmbildung**

Zur Erlangung des akademischen Grades einer

DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

**DISSERTATION**

von

**M. Sc. Miriam Edel**

1. Referent: Prof. Dr. Johannes Gescher

2. Referent: Prof. Dr. Harald Horn

Tag der mündlichen Prüfung: 20.07.2021



Dieses Werk ist lizenziert unter einer Creative Commons Namensnennung -  
Nicht kommerziell - Keine Bearbeitungen 4.0 International Lizenz (CC BY-NC-ND 4.0 DE):  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.de>

Erklärung an Eides statt

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

1. Bei der eingereichten Dissertation zu dem Thema „Verbesserung der Produktivität von *Shewanella oneidensis* in bioelektrochemischen Systemen durch erhöhte Biofilmbildung“ handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.

2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.

3. Die Arbeit oder Teile davon habe ich bislang nicht an einer Hochschule des In- oder Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt.

4. Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärungen bestätige ich.

5. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt.

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

---

Ort und Datum

---

Unterschrift

## **Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge**

### Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden in den folgenden Fachzeitschriften veröffentlicht. Diese Arbeit bezieht sich in einigen Abschnitten auf den Inhalt der folgenden Publikationen, was stets kenntlich gemacht wurde.

Arinda, T., Philipp, L.-A., Rehnlund, D., Edel, M., Chodorski, J., Stöckl, M., Holtmann, D., Ulber, R., Gescher, J., Sturm-Richter, K. (2019). Addition of riboflavin-coupled magnetic beads increases current production in bioelectrochemical systems via the increased formation of anode-biofilms. *Front Microbiol*, 10, 126.

Edel, M., Horn, H., & Gescher, J. (2019). Biofilm systems as tools in biotechnological production. *Appl Microb Biotechnol*, 103(13), 5095-5103.

Dietrich, H. M., Edel, M., Bursac, T., Meier, M., Sturm-Richter, K., & Gescher, J. (2019). Soluble versions of outer membrane cytochromes function as exporters for heterologously produced cargo proteins. *Microb Cell Fact*, 18(1), 1-10.

Philipp, L.-A., Edel, M., Gescher, J. (2020). Genetic engineering for enhanced productivity in bioelectrochemical systems. *Adv Appl Microb*, Vol. 111.

Silva, A. V., Edel, M., Gescher, J., and Paquete, C.M. (2020) Exploring the effects of *bolA* in biofilm formation and current generation by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Front Microbiol*, 11: 815.

Edel, M., Sturm, G., Sturm-Richter, K., Wagner, M., Novion-Ducassou, J., Couté, Y., Horn, H., Gescher, J. (2021). Extracellular riboflavin induces anaerobic biofilm formation in *Shewanella oneidensis*. *Biotechnol Biofuels* 10.1186.

## Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge

### Vorträge und Konferenzbeiträge

- Oktober 2020** biofilms 9, online Konferenz – Vortrag
- September 2020** 3<sup>rd</sup> International Bioeconomy Congress Baden-Württemberg, online Konferenz – Vortrag
- Oktober 2019** ISMET7, International society for microbial electrochemistry and technology, global conference, Okinawa (JP) – Posterpräsentation und Kurzvortrag
- November 2019** Plattforminitiative „Mikrobielle Bioelektrotechnologie“, Ruhr Universität Bochum – Vortrag
- Juli 2019** 3rd MEEP Symposium, Microbial and Enzymatic Electrochemistry Platform, European Fuel Cell Forum, Luzern (CH) – Vortrag
- März 2019** Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie, Wolfsburg – Posterpräsentation

# Inhaltsverzeichnis

## Inhaltsverzeichnis

Erklärung an Eides statt.....	I
Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge .....	II
Inhaltsverzeichnis.....	IV
Zusammenfassung .....	VII
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Tabellenverzeichnis.....	XI
Abkürzungsverzeichnis.....	XII
<b>I. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1. Mikrobielle Produktion von Basischemikalien.....	1
2. Möglichkeiten des extrazellulären Elektronentransfers .....	2
3. Extrazellulärer Elektronentransfer in <i>S. oneidensis</i> MR-1.....	3
4. Mikrobielle Elektrolysezellen als Form von bioelektrochemischen Systemen .....	5
5. <i>S. oneidensis</i> in bioelektrochemischen Systemen .....	6
6. Biofilme in bioelektrochemischen Systemen.....	7
7. Biofilmbildung durch <i>Quorum sensing</i> .....	9
8. Biofilmbildung von <i>S. oneidensis</i> in bioelektrochemischen Systemen .....	10
9. Die Funktion von Riboflavin in <i>S. oneidensis</i> .....	12
10. Das Produktspektrum von <i>S. oneidensis</i> und dessen Erweiterung um Acetoin .....	13
11. Das Substratspektrum von <i>S. oneidensis</i> und dessen Erweiterung um Glukose .....	15
12. Zielsetzung der Arbeit.....	18
<b>II. Material und Methoden.....</b>	<b>19</b>
1. Mikroorganismen und Plasmide .....	19
2. Chemikalien und Enzyme.....	20
3. Medien und Kultivierung .....	20
3.1. Medien zur Kultivierung.....	21
3.2. Stammkonservierung .....	23
4. Molekularbiologische Methoden.....	23
4.1. Isolation von Nukleinsäuren .....	23
4.2. cDNA-Synthese.....	24
4.3. Polymerase-Kettenreaktion .....	25
4.4. Sequenzierung .....	30
4.5. Restriktion und Ligation .....	31
4.6. Agarose-Gelelektrophorese .....	33

## Inhaltsverzeichnis

4.7.	Quantifizierung von Nukleinsäuren .....	34
4.8.	Herstellung kompetenter Zellen und Transformation .....	34
4.9.	Konjugation und markerlose Modifikation von Genen in <i>S. oneidensis</i> .....	35
4.10.	Bioinformatische Auswertung von Sequenzierdaten.....	36
5.	Proteinbiochemische Methoden .....	37
5.1.	Zellaufschluss .....	37
5.2.	Proteinquantifizierung .....	37
5.3.	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese.....	38
5.4.	Proteinfärbung .....	39
5.5.	Proteomanalyse .....	39
6.	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) .....	40
6.1.	Quantifizierung von Zuckern und organischen Säuren .....	40
6.2.	Quantifizierung von Flavinen .....	41
7.	Anzucht und Analyse von Biofilm in mikrofluidischen Kultivierungs-Plattformen .....	41
7.1.	Herstellung mikrofluidischer Kultivierungs-Plattformen .....	41
7.2.	Wachstum des Biofilms in mikrofluidischen Kultivierungs-Plattformen.....	42
7.3.	Optische Kohärenztomografie .....	42
7.4.	Ermittlung des Biofilmvolumens .....	42
8.	Bioelektrochemische Systeme .....	43
8.1.	Aufbau und Inbetriebnahme der BES .....	43
8.2.	Adaptation .....	44
9.	Quantifizierung von Wachstum auf Eisencitrat .....	45
<b>III.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>46</b>
1.	Biofilminduktion durch Riboflavin .....	46
1.1.	Einfluss von Riboflavin auf die Genexpression.....	46
1.2.	Einfluss der durch Riboflavin regulierten Gene auf die Biofilmbildung und Stromproduktion in BES... .....	47
1.3.	Einfluss verschiedener Riboflavin-Konzentrationen auf die Expression von <i>speC</i> .....	49
1.4.	Funktionsweise der Biofilmbildung durch Riboflavin.....	52
1.5.	Einfluss der Epimerase WbpP auf die Biofilmbildung und Stromdichte in BES .....	57
1.6.	Native Riboflavin-Produktion von <i>S. oneidensis</i> planktonisch und im Biofilm.....	58
2.	Erweiterung des Produkt- und Substratspektrums mit optimierter Raum-Zeit-Ausbeute.....	61
2.1.	Stammentwicklung und Adaptation .....	62
2.2.	Einfluss des Anodenpotentials auf das Endproduktspektrum .....	63
2.3.	Wachstum adaptierter Einzelklone auf Eisencitrat.....	66
2.4.	Stromdichte und Biofilmbildung adaptierter Einzelklone.....	69
2.5.	Genom-Resequenzierung.....	75

# Inhaltsverzeichnis

<b>IV. Diskussion .....</b>	<b>78</b>
1. Riboflavin als <i>Quorum sensing</i> -Molekül .....	78
1.1. Einfluss von Riboflavin auf die Genexpression.....	79
1.2. Einfluss der durch Riboflavin regulierten Gene auf die Biofilmbildung und die Stromproduktion ...	80
1.3. Einfluss verschiedener Riboflavin-Konzentrationen auf die Expression von <i>speC</i> .....	82
1.4. Funktionsweise der Biofilmbildung durch Riboflavin.....	83
1.5. Native Flavin-Produktion von <i>S. oneidensis</i> planktonisch und im Biofilm .....	87
2. Erweiterung des Produkt- und Substratspektrums mit optimierter Raum-Zeit-Ausbeute.....	89
2.1. Stammentwicklung und Adaptation .....	89
2.2. Einfluss verschiedener Anodenpotentiale .....	91
2.3. Analyse der adaptierten Einzelklone.....	92
2.4. Genomische Anpassungen der adaptierten Einzelklone.....	93
3. Zusammenfassung und Ausblick.....	97
<b>V. Literatur .....</b>	<b>100</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>115</b>
<b>Beruflicher und wissenschaftlicher Werdegang.....</b>	<b>117</b>

### Zusammenfassung

Die begrenzte Verfügbarkeit fossiler Ressourcen erfordert die Umstellung industrieller Prozesse hin zur Verwendung nachhaltiger Rohstoffe. Eine Möglichkeit der nachhaltigen Synthese von Basischemikalien bietet dabei die Anoden-assistierte Fermentation. Hierbei fungieren Bakterien als Ganzzellkatalysatoren, die den Elektronenüberschuss ihres Katabolismus auf eine Anode in einem bioelektrochemischen System (BES) übertragen. Der Modellorganismus für den extrazellulären Elektronentransfer, *Shewanella oneidensis*, ist ein vielversprechender Kandidat zur mikrobiellen Synthese von Basischemikalien in BES. *S. oneidensis* ist von Natur aus in der Lage, Elektronen auf Anoden zu übertragen und daher für die Anwendung in BES prädestiniert. Durch die einfache genetische Zugänglichkeit ist zudem die Anpassung an verschiedene Produktionsbedingungen möglich. Eine notwendige Optimierung des Organismus mit Blick auf eine industrielle Anwendung ist eine verbesserte Biofilmbildung. Dadurch ließen sich möglicherweise die erreichbaren Stromdichten und damit die Raum-Zeit-Ausbeuten von BES drastisch steigern. In dieser Arbeit wurde die Funktionsweise der Riboflavin-induzierten Biofilmbildung von *S. oneidensis* untersucht, um die molekularen Mechanismen der Biofilmbildung besser zu verstehen und eine gezielte Biofilminduktion zu ermöglichen. Dabei wurde die Funktion von Riboflavin als *Quorum sensing*-Molekül in *S. oneidensis* aufgeklärt. Riboflavin induziert konzentrationsabhängig die Expression des Gens der Ornithin-Decarboxylase SpeC. Die Überexpression von SpeC führt wiederum durch Protein-Protein Interaktion zu einer vermehrten Biofilmbildung einhergehend mit einer gesteigerten Stromdichte in BES. Des Weiteren wurde die natürliche Riboflavin-Produktion von *S. oneidensis* untersucht und festgestellt, dass die zur Induktion des Biofilms nötige Riboflavin-Konzentration unter nativen Bedingungen durch den Organismus synthetisiert werden kann.

Neben der Biofilmbildung ist die Erweiterung des Substrat- und Produktspektrums von *S. oneidensis* Gegenstand der aktuellen Forschung. Die Erweiterung des Substratspektrums um Glukose sowie des Produktspektrums um Acetoin konnten bereits etabliert werden, gingen allerdings mit geringen Umsatzraten einher. Um diese zu erhöhen und damit die Raum-Zeit-Ausbeute zu verbessern, wurde in dieser Arbeit ein optimierter Produktionsstamm erstellt. Dieser sollte den Glukoseverbrauch mit der Acetoinproduktion vereinen und durch eine Langzeitadaptation erhöhte Raum-Zeit-Ausbeuten ermöglichen. Sowohl die Stromdichte, und damit der Glukoseverbrauch, als auch die Biofilmbildung konnten durch den neuen Produktionsstamm nach der Langzeitadaptation erfolgreich verbessert werden. Allerdings war

## Zusammenfassung

die Produktion von Acetoin nicht möglich, da der Kohlenstoff in die Produktion von Laktat umgeleitet wurde. Durch die Genomanalyse zweier adaptierter Klone konnte ein detaillierter Einblick in die Regulation der Biofilmbildung unter den Adaptationsbedingungen gewonnen werden. Mithilfe dieser Informationen könnte bei einem zukünftigen Produktionsstamm gezielt die Biofilmbildung induziert werden und so durch eine verbesserte Anodeninteraktion eine industriell lohnenswerte Raum-Zeit-Ausbeute erzielt werden.

**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Möglichkeiten zum Elektronenübertrag auf unlösliche extrazelluläre Elektronenakzeptoren..... 3

Abbildung 2: EET in *S. oneidensis*. ..... 4

Abbildung 3. Aufbau einer MEZ. .... 6

Abbildung 4: Einflussmöglichkeiten von *Quorum sensing* auf die Biofilmbildung..... 10

Abbildung 5: Erweiterung des Produktspektrums von *S. oneidensis* um Acetoin..... 15

Abbildung 6: Erweiterung des Substratspektrums von *S. oneidensis* um Glukose..... 17

Abbildung 7: Aufbau eines BES. .... 44

Abbildung 8: Mittlere Stromdichte unter Zugabe von Riboflavin sowie bei Überexpression und Deletion der Ornithin-Decarboxylase *speC* im Vergleich zu *S. oneidensis* WT..... 48

Abbildung 9: Stromdichte bei Deletion der Sortase *srtA* im Vergleich zu *S. oneidensis* WT. .... 49

Abbildung 10: Expression der Ornithin-Decarboxylase *speC* unter Zugabe von 5 – 100 nM Riboflavin..... 50

Abbildung 11: Einfluss des von *S. oneidensis* synthetisierten Riboflavins auf die Expression von *speC*. .... 51

Abbildung 12: Einfluss von FAD und FMN auf die Expression von *speC*. .... 52

Abbildung 13: Einfluss von Putrescin auf die Stromdichte und Biofilmbildung von *S. oneidensis* WT in BES. .... 54

Abbildung 14: Einfluss von *wbpP* und *wbpA* auf die Stromdichte und Biofilmbildung von *S. oneidensis* in BES..... 58

Abbildung 15: Wachstum und Substratabbau von *S. oneidensis* WT unter anoxischen Bedingungen..... 59

Abbildung 16: Flavin-Produktion und -Sekretion von *S. oneidensis* WT unter anoxischen Bedingungen..... 60

Abbildung 17: Biofilmwachstum, Flavin-Produktion und Substratabnahme eines *S. oneidensis* WT Biofilms..... 61

Abbildung 18: Stromdichte der Adaptation von *S. oneidensis*  $\Delta\lambda \Delta ackA pta \Delta ldhA::glk\_galP$  pBAD\_alsSD auf Glucose in BES. .... 63

Abbildung 19: Mittlere Stromdichte der Mischkultur aus 87 adaptierten *S. oneidensis* Klonen nach 16 Tagen bei einem Potential von 0 mV gegen NHE und 200 mV gegen NHE. .... 64

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 20: Wachstum der adaptierten Klone auf M4-Eisencitrat-Medium im Vergleich zum Ausgangsstamm. ....	67
Abbildung 21: Wachstum der adaptierten Klone auf M4-Eisencitrat-Medium im Oktaplikat im Vergleich zum Ausgangsstamm.....	68
Abbildung 22: Mittlere Stromdichte und Biofilmbildung der adaptierten Klone in 86 h im Vergleich zum Ausgangsstamm.....	70
Abbildung 23: Verlauf der Stromkurven von Klon 10A und 4B im Vergleich zum Ausgangsstamm in 86 h. ....	71
Abbildung 24: Verlauf der Stromkurven von Klon 10A und 4B im Vergleich zum Ausgangsstamm in 140 h. ....	72
Abbildung 25: Mittlere Stromdichte und Biofilmbildung der adaptierten Klone in 140 h im Vergleich zum Ausgangsstamm.....	73
Abbildung 26: Substratumsatz und Produktkonzentrationen des Ausgangsstamms sowie der Klone 4B und 10A innerhalb von 140 h. ....	74
Abbildung 27: Coulombsche Effizienz und Ertrag des Ausgangsstamms sowie der Klone 4B und 10A. ....	75
Abbildung 28: Umwandlung von Uridindiphosphat-N-Acetylglukosamin durch WbpP und WbpA. ....	86

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme. .... 19

Tabelle 2: Verwendete Komplementationslösungen..... 20

Tabelle 3: Zusammensetzung des LB-Mediums..... 21

Tabelle 4: Zusammensetzung des M4-Mediums. .... 22

Tabelle 5: Zusammensetzung der 100x Spurenelementlösung..... 22

Tabelle 6: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur cDNA-Synthese..... 24

Tabelle 7: Inkubationsbedingungen zur cDNA-Synthese..... 25

Tabelle 8: Zur PCR verwendeten Oligonukleotide ..... 25

Tabelle 9: Zusammensetzung der 50 µl Ansätze für präparative PCRs..... 27

Tabelle 10: Protokoll zur präparativen PCR. .... 28

Tabelle 11: Zusammensetzung der 15 µl Ansätze für analytische PCRs..... 28

Tabelle 12: Protokoll zur analytischen PCR. .... 29

Tabelle 13: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur Amplifikation von cDNA und DNA.  
..... 30

Tabelle 14: Protokoll zur quantitativen PCR. .... 30

Tabelle 15: Anzahl der generierten *reads* pro Genom-Probe..... 31

Tabelle 16: Anzahl der generierten *reads* pro Transkriptom-Probe..... 31

Tabelle 17: Zusammensetzung der Restriktionsansätze..... 32

Tabelle 18: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur *in-vitro*-Ligation nach Gibson. .... 32

Tabelle 19: Zusammensetzung der 5 x Stammlösung für Ligationsansätze. .... 33

Tabelle 20: Zusammensetzung des TAE-Puffers..... 33

Tabelle 21: Zusammensetzung des 6 x Ladepuffers für die Agarose-Gelelektrophorese..... 34

Tabelle 22: Zusammensetzung des Bradfordreagenz..... 38

Tabelle 23: Zusammensetzung des 6 x Laemmli-Ladepuffers. .... 38

Tabelle 24: Komponenten des SDS-Laufpuffers. .... 39

Tabelle 25: Signifikant differentiell exprimierte Gene nach Riboflavin-Zugabe.. .... 47

Tabelle 26: Signifikant regulierte Proteine durch die Überexpression der Ornithin-Decarboxylase *speC*. .... 56

Tabelle 27: Substratverbrauch und Produktkonzentration der Mischkultur aus 87 adaptierten *S. oneidensis* Klonen nach 16 Tagen bei einem Potential von 0 mV gegen NHE und 200 mV gegen NHE. .... 65

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 28: Ertrag der Mischkultur aus 87 adaptierten <i>S. oneidensis</i> Klonen nach 16 Tagen bei einem Potential von 0 mV gegen NHE und 200 mV gegen NHE. ....	65
Tabelle 29: maximale Wachstumsrate der adaptierten Klone auf M4-Eisencitrat-Medium....	68
Tabelle 30: Durch die Langzeitadaptation entstandene Veränderungen im Genom des Ausgangsstamms und im zugehörigen pBAD <sub>P<sub>stc</sub></sub> <i>alsSD</i> -Plasmid. ....	76

**Abkürzungsverzeichnis**

<b>Abkürzung</b>	<b>Erklärung</b>
(d)dH <sub>2</sub> O	(zweifach) deionisiertes Wasser
BES	Bioelektrochemisches System
bp	Basenpaare
CE	Coulomb-Effizienz
EET	Extrazellulärer Elektronentransfer
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
LB	Lysogeny-Broth
MEZ	Mikrobielle Elektrolysezelle
NHE	Standard-Wasserstoff-Elektrode
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei $\lambda = 600$ nm
OCT	Optische Kohärenztomografie
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
rpm	Umdrehung pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE-Puffer	Tris-Ammoniumacetat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
WT	Wildtyp

### I. Einleitung

#### 1. Mikrobielle Produktion von Basischemikalien

Durch die zunehmende Verknappung fossiler Ressourcen rückt eine nachhaltige Produktion von industriellen Basischemikalien immer mehr in den Fokus der Wissenschaft. Bereits 2004 hat das *U.S. Department of Energy* eine Übersicht der vielversprechendsten Basischemikalien aus Biomasse erstellt (Werpy und Petersen, 2004). Eine nachhaltige Möglichkeit zur Produktion von Basischemikalien stellt die mikrobielle Synthese dar. Hierbei haben mehrere Aspekte Einfluss auf die Effizienz des Prozesses. Es muss betrachtet werden, wie hoch die Raum-Zeit-Ausbeute des Produkts ist, wie viel des Substrats in das Produkt umgewandelt wird und wie viele Nebenprodukte bei der Umwandlung entstehen (Philipp *et al.*, 2020). Um eine möglichst hohe Umwandlung des Substrats in das gewünschte Produkt zu erreichen, ist ein geringes Wachstum und damit eine geringe anabole Substratverwertung des Organismus erforderlich. Eine Produktionsweise, bei der diese Bedingung erfüllt ist, ist die anoxische Fermentation (Müller, 2008). Bei dieser Produktionsweise sind allerdings die Oxidationsstufen der Endprodukte limitiert. Da in einer Fermentation die Reduktionsäquivalente der Substratstufenphosphorylierung ohne externen Elektronenakzeptor regeneriert werden müssen, werden Intermediate des Zentralstoffwechsels wieder reduziert. Die entstehenden Produkte weisen so im Mittel dieselbe Oxidationsstufe auf, wie das Substrat. Das bedeutet, dass entweder ein gemischtes Endproduktspektrum synthetisiert werden kann, in dem einige Produkte stärker und einige weniger stark oxidiert sind als das Substrat, oder ein einzelnes Endprodukt mit derselben Oxidationsstufe wie die des Substrats produziert werden kann (Müller, 2001). Um die Synthese stärker oxidiertes, alleiniger Endprodukte zu ermöglichen, ist die Zugabe eines Elektronenakzeptors, wie zum Beispiel Sauerstoff, erforderlich. Dies erhöht allerdings den Energiebedarf des Produktionsprozesses deutlich. Des Weiteren nimmt durch die Zugabe von Sauerstoff die anabole Energiegewinnung zu, was zu einem verschlechterten Substrat-Produkt-Verhältnis führt. Eine Möglichkeit, die Vorteile der Fermentation und der oxischen Produktion zu vereinen, ist die sogenannte Anoden-assistierte Fermentation (Flynn *et al.*, 2010). Hierbei wird statt eines löslichen, abbaubaren Elektronenakzeptors wie Sauerstoff die Anode eines bioelektrochemischen Systems (BES) als Elektronenakzeptor eingesetzt. Anoden sind im Gegensatz zu herkömmlichen Elektronenakzeptoren nicht abbaubar und müssen dadurch nicht kontinuierlich zugegeben werden. Zudem kann das Potential der Anode in einem BES mithilfe eines Potentiostaten eingestellt werden, wodurch die Kinetik des Prozesses beeinflusst werden kann (Sydow *et al.*, 2014; Nakagawa *et al.*, 2015). So können eine hohe Raum-Zeit-Ausbeute,

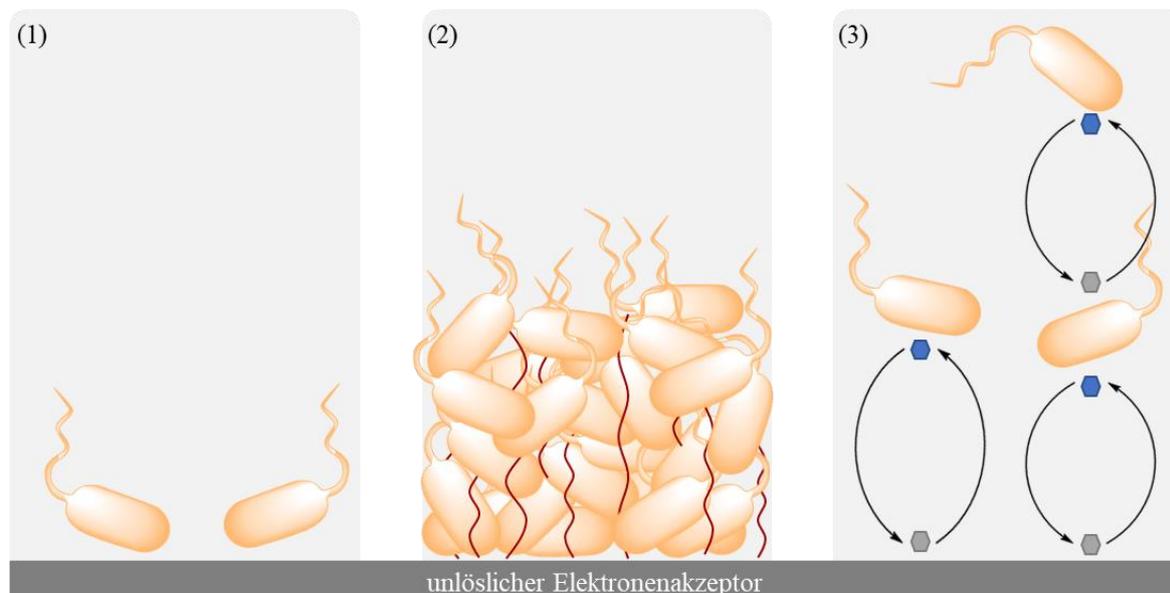
ein hohes Substrat-Produkt-Verhältnis und ein alleiniges Endprodukt erzielt werden. Allerdings ist für die Verwendung von BES ein Mikroorganismus nötig, der in der Lage ist, die anfallenden Elektronen auf extrazelluläre Elektronenakzeptoren zu übertragen.

### **2. Möglichkeiten des extrazellulären Elektronentransfers**

Um respiratorische Elektronen auf unlösliche, extrazelluläre Elektronenakzeptoren, wie zum Beispiel Anoden, zu übertragen, haben Mikroorganismen verschiedene Strategien entwickelt (Lovley and Phillips, 1988; Richter *et al.*, 2012). Der extrazelluläre Elektronentransfer (EET) erfolgt in Gram-negativen Organismen typischerweise über mehrere *c*-Typ Cytochrome, die in der inneren Membran, im Periplasma und in der äußeren Membran lokalisiert sind (Richter *et al.*, 2012).

Natürliche exoelektrogene Mikroorganismen haben verschiedene Mechanismen entwickelt, um Elektronen von der äußeren Membran auf unlösliche Elektronenakzeptoren, wie Anoden, zu übertragen. Prinzipiell lassen sich die bakteriellen Elektronentransfermechanismen in drei Gruppen einteilen. Einige Mikroorganismen sind in der Lage, Elektronen direkt auf Anoden zu übertragen (Abb. 1 (1)) (Clarke *et al.*, 2011). Es wird davon ausgegangen, dass der Abstand zwischen Cytochromen und Elektronenakzeptor dabei maximal 9-10 Å betragen darf (Marcus and Sutin, 1985; Wendoloski *et al.*, 1987; Neal *et al.*, 2003; Kerisit *et al.*, 2007). Des Weiteren können einige Mikroorganismen mehrere Zellschichten dicke, leitfähige Biofilme bilden. In diesen Biofilmen findet der Elektronentransfer mithilfe von sogenannten *nanowires* statt. Dies sind in die extrazelluläre Matrix eingebettete, lösliche Cytochrome oder andere Elektronentransfer-Moleküle (Abb. 1 (2)) (Reguera *et al.*, 2005; Sure *et al.*, 2016; Lovley and Walker, 2019). Eine weitere Möglichkeit des Elektronentransfer zur Anode ist die Synthese und Sekretion von löslichen Redoxshuttles oder die Verwendung von exogenen Shuttle-Molekülen, die mehrere Redox-Zyklen durchlaufen können (Abb. 1 (3)) (Gralnick and Newman, 2007; Marsili *et al.*, 2008; Velasquez-Orta *et al.*, 2010). Diese Redoxshuttles, wie z. B. Riboflavin (bei *Shewanella oneidensis*) oder Phenazin (bei *Pseudomonas aeruginosa*), können Elektronen von planktonischen Zellen aufnehmen und auf die Anode übertragen (Wang *et al.*, 2010; Kotloski and Gralnick, 2013).

## Einleitung



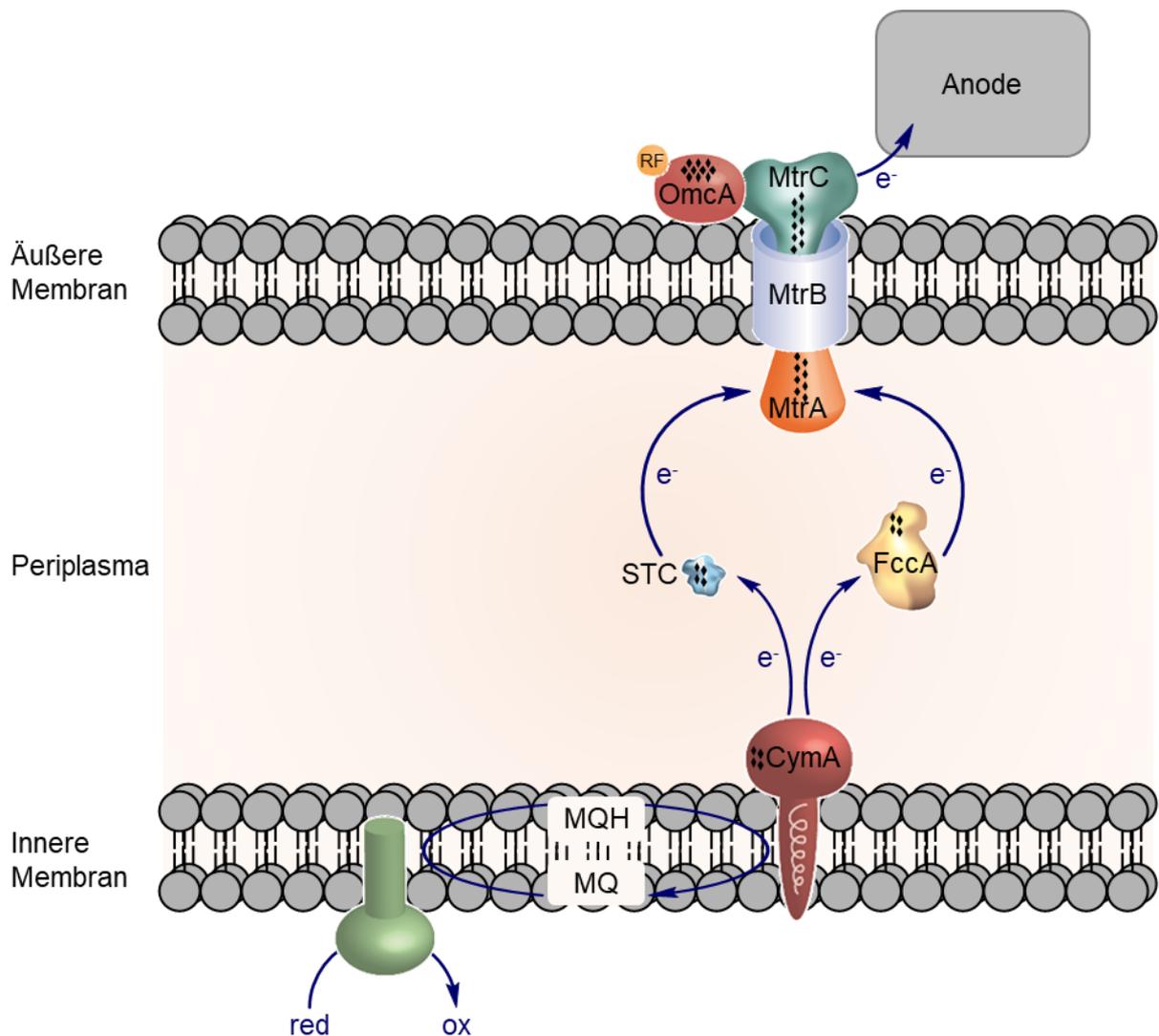
**Abbildung 1: Möglichkeiten zum Elektronenübertrag auf unlösliche extrazelluläre Elektronenakzeptoren.** (1) direkter Elektronenübertrag von der Zelloberfläche auf den unlöslichen Elektronenakzeptor. (2) Elektronenübertrag durch einen leitfähigen, mit *nanowires* durchsetzten, mehrschichtigen Biofilm. (3) Elektronenübertrag durch die Verwendung von Elektronenshuttles (modifiziert nach Philipp *et al.*, 2020).

### 3. Extrazellulärer Elektronentransfer in *S. oneidensis* MR-1

Bislang wurden mindestens neun verschiedene Bakterienspezies für die Produktion von Basischemikalien in BES verwendet. Die verwendeten Mikroorganismen sind entweder von Natur aus in der Lage, unlösliche Elektronenakzeptoren zu nutzen, oder sie wurden durch genetische Modifikationen oder die Zugabe von Elektronenshuttles dazu befähigt. Die am besten verstandenen Organismen gehören jedoch zu den Familien der *Shewanellaceae* und *Geobacteraceae*. Sowohl *S. oneidensis* als auch *Geobacter sulfurreducens* sind auf ein Netzwerk von *c*-Typ Cytochromen angewiesen, das das Periplasma und die äußere Membran überspannt. Das Genom von *S. oneidensis* kodiert für 41 *c*-Typ Cytochrome mit teilweise überlappenden Funktionen (Heidelberg *et al.*, 2002). *S. oneidensis* überträgt Elektronen aus dem Menachinon-Pool in das Periplasma über das tetrahäm *c*-Typ Cytochrom CymA (Abb. 2) (McMillan *et al.*, 2012). Dabei ist CymA nicht nur an dem Elektronenübertrag auf Eisen oder Anoden beteiligt, sondern liefert die aufgenommenen Elektronen an verschiedene periplasmatische Elektronentransportketten, die z. B. Fumarat, Dimethylsulfoxid, Nitrat oder Nitrit reduzieren (Myers and Myers, 2000; Schwalb *et al.*, 2002; Schwalb *et al.*, 2003). Von CymA werden die Elektronen unter anderem auf die löslichen, periplasmatischen *c*-Typ Cytochrome STC oder FccA übertragen. Diese übertragen die Elektronen auf einen die äußere Membran durchspannenden trimeren Porin-Cytochrom-Komplex, welcher die aufgenommenen Elektronen an terminale Elektronenakzeptoren weiterleitet. In *S. oneidensis*

## Einleitung

besteht der membrandurchspannende Komplex aus dem auf der inneren Membranseite gelegenen *c*-Typ Cytochrom MtrA, dem Porin MtrB und dem terminalen *c*-Typ Cytochrom MtrC. Lose an MtrC gebunden ist die zweite terminale Reduktase OmcA (Shi *et al.*, 2006). Sowohl MtrC als auch OmcA enthalten Flavine als Cofaktoren. Diese beschleunigen den Elektronentransfer von den terminalen Reduktasen auf unlösliche extrazelluläre Elektronenakzeptoren und ermöglichen durch die Bildung von Semichinonen einen Elektronentransport (Okamoto *et al.*, 2013; Okamoto *et al.*, 2014a; Okamoto *et al.*, 2014b; Xu *et al.*, 2016a).

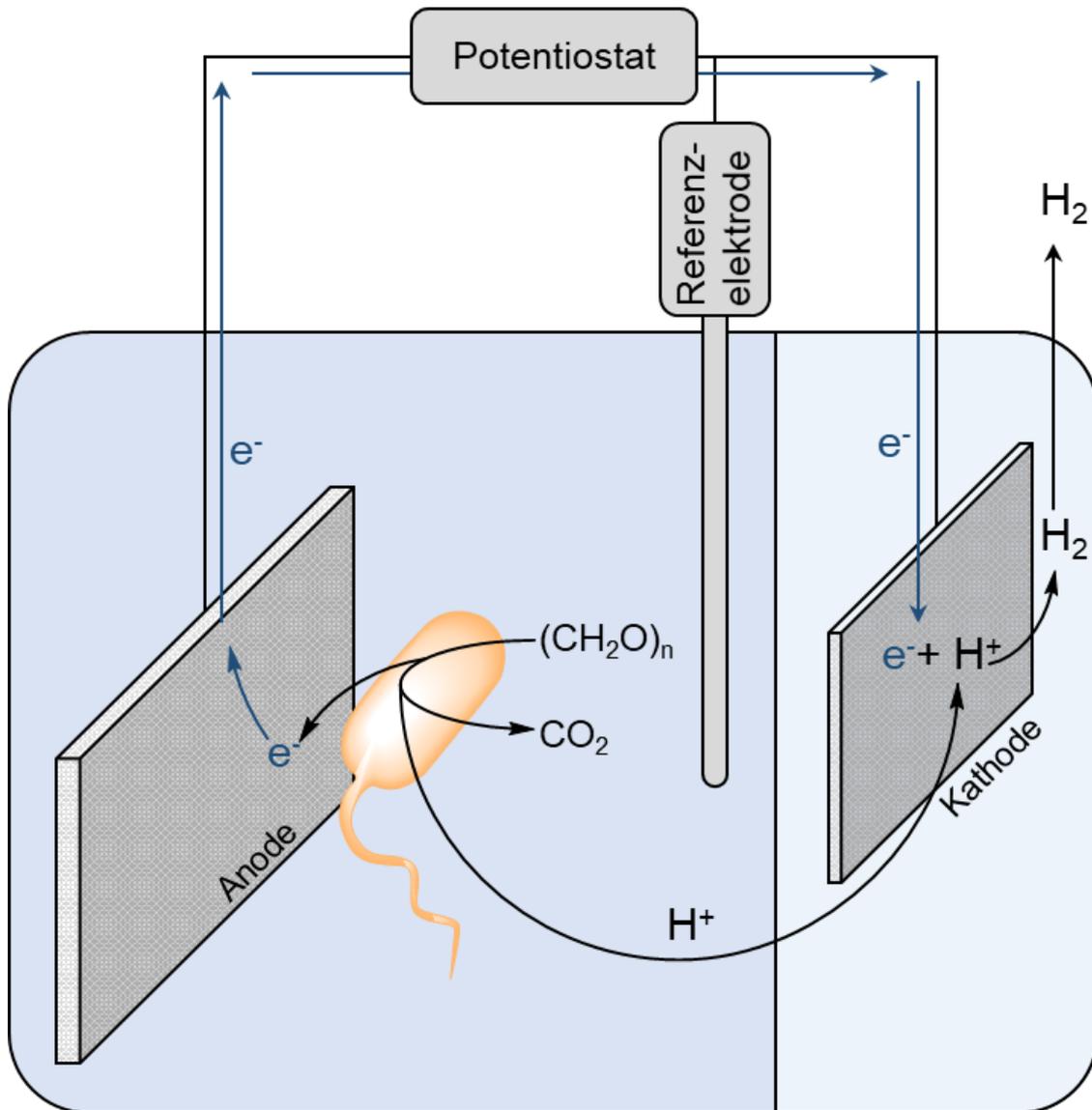


**Abbildung 2: EET in *S. oneidensis*.** Die Elektronen aus dem Cytoplasma werden durch die Oxidoreduktase in der inneren Membran aufgenommen und auf den Menachinonpool übertragen. Von Menachinon werden die Elektronen auf das *c*-Typ Cytochrom CymA übertragen, welches die Elektronen an periplasmatische *c*-Typ Cytochrome weitergibt. Von FccA und STC können die Elektronen weiter auf MtrA als Teil des MtrABC-Komplexes übertragen werden. Von MtrC oder dem angelagerten *c*-Typ Cytochrom OmcA werden die Elektronen schließlich auf den terminalen Elektronenakzeptor übertragen. Der terminale Elektronenakzeptor ist im Fall eines BES die Anode. Die schwarzen Rauten innerhalb der abgebildeten Proteine zeigen die Anzahl der Häm-Gruppen.

### **4. Mikrobielle Elektrolysezellen als Form von bioelektrochemischen Systemen**

BES sind in sich geschlossene Systeme, die sich in einen Anoden- und einen Kathodenbereich aufteilen. Bei anodischen Systemen werden die durch den Stoffwechsel anfallenden Elektronen auf die Arbeitselektrode, in diesem Fall die Anode, übertragen (Liu *et al.*, 2005). Bei kathodischen Systemen werden die Elektronen von der Arbeitselektrode, in diesem Fall die Kathode, abgegeben (Rabaey *et al.*, 2009). In dieser Arbeit wird insbesondere auf eine spezielle Art der anodischen BES eingegangen – die mikrobielle Elektrolysezelle (MEZ).

In einer MEZ wird mithilfe einer Referenzelektrode und eines Potentiostaten ein definiertes Potential an die Anode angelegt. Die durch die Mikroorganismen auf die Anode übertragenen Elektronen wandern über den Potentiostaten an die Kathode und können dort mit den von der Anode ausgehenden  $H^+$ -Ionen zu Wasserstoff reagieren (Liu *et al.*, 2005). Durch eine kleine Öffnung im Kathodenbereich ist ein Entweichen des entstehenden Wasserstoffs möglich (Abbildung 3). So entsteht zum einen an der Anode das Produkt aus dem bakteriellen Metabolismus und zum anderen an der Kathode Wasserstoff als wertvolles Nebenprodukt. Die erreichte Stromdichte spiegelt direkt den Substratumsatz wieder und gibt damit Aufschluss über die Umwandlungsgeschwindigkeit des Substrats in das gewünschte Produkt. Für die Effizienz von MEZ ist eine optimale Interaktion des Organismus mit der Anode erforderlich. Diese Interaktion kann zum Beispiel durch Ausbilden eines konduktiven Biofilms stattfinden.



**Abbildung 3. Aufbau einer MEZ.** Im Anodenkompartiment wandelt der Organismus das Substrat zum Produkt um. Die dabei anfallenden Elektronen werden auf die Anode übertragen. Von der Anode fließen die Elektronen über den Potentiostat an die Kathode, wo sie mit  $\text{H}^+$ -Ionen von der Anode zu Wasserstoff reagieren. Durch die Referenzelektrode kann das Anodenpotential eingestellt werden.

### 5. *S. oneidensis* in bioelektrochemischen Systemen

Durch die native Fähigkeit von *S. oneidensis*, extrazelluläre Elektronenakzeptoren, wie Anoden zu verwenden, ist der Einsatz des Organismus in BES ohne genetische Modifikationen möglich. Durch die in Abschnitt I.3. (siehe I.3. Extrazellulärer Elektronentransfer in *S. oneidensis* MR-1) beschriebenen Mechanismen ist *S. oneidensis* in der Lage, statt natürlich vorkommender, unlöslicher, extrazellulärer Elektronenakzeptoren auch Anoden in BES zu nutzen. Um die respiratorischen Elektronen von der Zelloberfläche auf die Anode zu übertragen nutzt *S. oneidensis* sowohl den direkten Elektronentransfer als auch den Elektronentransfer mithilfe von Elektronen-shuttles (siehe I.2. Möglichkeiten des extrazellulären Elektronentransfers).

## Einleitung

Im Gegensatz zu herkömmlichen biotechnologischen Produktionsstämmen hat *S. oneidensis* allerdings ein sehr eingeschränktes Substratspektrum. Der Mikroorganismus kann in bioelektrochemischen Systemen lediglich Laktat, N-Acetylglucosamin und einige Gärungsendprodukte, wie Formiat und Pyruvat, als Substrat nutzen (Meshulam-Simon *et al.*, 2007; Hunt *et al.*, 2010). Um eine breite Anwendung von *S. oneidensis* in BES zu ermöglichen, wird in dieser Arbeit der Ansatz verfolgt, das Substratspektrum zu erweitern und dem Organismus die Verwendung von Glukose als Substrat zu ermöglichen. Auch Acetat als natives Produkt von *S. oneidensis* bringt einen geringen Mehrwert für biotechnologische Anwendungen. Daher soll in dieser Arbeit die Produktion von Acetoin als vielseitig verwendbares Endprodukt optimiert werden.

Trotz der nativen Fähigkeit zum Metabolismus in BES ist die Elektronenübertragungsrate von *S. oneidensis* relativ gering. Im Vergleich zu anderen exoelektrogenen Organismen, wie zum Beispiel *G. sulfurreducens*, erreicht *S. oneidensis* nur etwa 1 % der Stromdichte (Kipf *et al.*, 2014). Dies spiegelt sich auch in einer geringen Raum-Zeit-Ausbeute des Produkts wieder.

Laut Marsili und Kolleg:innen ist *S. oneidensis* in BES in einem deutlich höheren Maße auf die Übertragung von Elektronen aus der planktonischen Phase angewiesen als *G. sulfurreducens*. Um die Elektronen von planktonischen Zellen zur Anode transportieren zu können, bildet und sekretiert *S. oneidensis* Flavine (Marsili *et al.*, 2008). Diese können in mehreren Zyklen Elektronen von *S. oneidensis* aufnehmen und an die Anode abgeben. Nach der Oxidation an der Anode können die Flavine wieder zu den Mikroorganismen diffundieren und erneut Elektronen aufnehmen. Allerdings benötigt *S. oneidensis* zur Synthese eines Mols Riboflavin bis zu 25 Mol ATP (Bacher *et al.*, 2000; Dauner *et al.*, 2002). Des Weiteren ist für einen kontinuierlichen Betrieb eines Reaktors ein Biofilm zu bevorzugen, da weder die Zellen noch die Elektronenshuttle im Zuge eines Medienaustauschs ausgeschwemmt werden können.

Alle hier beschriebenen Nachteile von *S. oneidensis* können allerdings durch seine einfache genetische Zugänglichkeit ausgeglichen werden. Hierdurch könnte es möglich sein, die Engpässe des Produktionsprozesses zu überwinden und einen optimierten Produktionsstamm zu generieren. Im Folgenden wird dargelegt, wie die Limitationen von *S. oneidensis* in bioelektrochemischen Systemen überwunden werden könnten.

## 6. Biofilme in bioelektrochemischen Systemen

Ein Ansatz, um die Effizienz von *S. oneidensis* als Produktionsorganismus zu erhöhen, ist eine konduktive Biofilmbildung in BES zu ermöglichen. Um Biofilmbildung gezielt induzieren zu

## Einleitung

können, muss allerdings zunächst der Aufbau und die Entstehung von Biofilmen verstanden werden.

Als Biofilm werden Aggregate von Mikroorganismen bezeichnet, die sich an Grenzflächen anheften (Flemming *et al.*, 2016). Diese Zellaggregate sind eingebettet in eine Matrix aus Kohlenhydratpolymeren, Proteinen und Nukleinsäuren. Diese Biofilm-Matrix wird auch als extrazelluläre polymere Substanz (EPS) bezeichnet (Wingender *et al.*, 1999; Flemming and Wingender, 2010; Seviour *et al.*, 2019). Durch die Biofilmmatrix wird die Stabilität des Biofilms gesteigert und der Biofilm wird vor Austrocknung oder anderen schädlichen Umwelteinflüssen, wie zum Beispiel Antibiotika, geschützt. Bislang werden Biofilme häufig als unerwünschte Bakterienansammlungen betrachtet, die technische Prozesse stören oder die menschliche Gesundheit gefährden (Flemming, 2002; Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Percival *et al.*, 2015). Allerdings bieten Biofilme auch ein hohes Potential für biotechnologische Anwendungen. Dies liegt vor allem an der hohen Zelldichte mit bis zu 60 mg Trockenzellmasse pro ml (van Benthum *et al.*, 1997; Staudt *et al.*, 2004). Des Weiteren können Biofilmreaktoren über längere Zeiträume kontinuierlich betrieben werden, da die fest angehefteten Zellen nicht ausgeschwemmt werden. Die ersten biotechnologischen Prozesse, in denen das Potential von Biofilmen genutzt wurde, waren Abwasseraufbereitungen (Bouwer and Crowe, 2018). Doch auch in BES bieten Biofilme zahlreiche Vorteile im Vergleich zu planktonisch lebenden Mikroorganismen.

Durch die limitierte Anodenfläche in BES führt die Bildung eines leitfähigen Biofilms zu einer besseren Nutzung des Elektronenakzeptors. Dieser Effekt wird deutlich, wenn man die Stromausbeuten von *S. oneidensis* mit denen von *G. sulfurreducens* in BES vergleicht. Unter ähnlichen Bedingungen erreicht *G. sulfurreducens* eine etwa 100-fach höhere Stromdichte als *S. oneidensis* (Kipf *et al.*, 2014). Es wird vermutet, dass die erhöhte Stromausbeute durch den dicken, leitfähigen Biofilm von *G. sulfurreducens* zustande kommt. Dieser wird bis zu 40 µm dick, während durch die Einbettung von *nanowires* die Leitfähigkeit erhalten werden kann (Sun *et al.*, 2016). So kann der Organismus die angebotene Anodenfläche optimal ausnutzen und in kurzer Zeit viel Substrat umsetzen. Im Gegensatz dazu formt *S. oneidensis* unter anoxischen Bedingungen lediglich einen maximal 10 µm dicken Biofilm (Kitayama *et al.*, 2017). Da bei einer biotechnologischen Produktion mit *S. oneidensis* die Raum-Zeit-Ausbeute entscheidend ist, liegt ein Hauptaugenmerk dieser Arbeit darin, die Biofilmbildung des Mikroorganismus zu verstehen und zielgerichtet zu verbessern. Dabei muss allerdings beachtet werden, dass eine reine Biofilmbildung mit starker EPS-Synthese auch einen isolierenden und damit nachteiligen

Effekt in BES aufweisen kann (Herbert-Guillou *et al.*, 1999; Muñoz-Berbel *et al.*, 2006; Dheilly *et al.*, 2008; Philipp *et al.*, 2020).

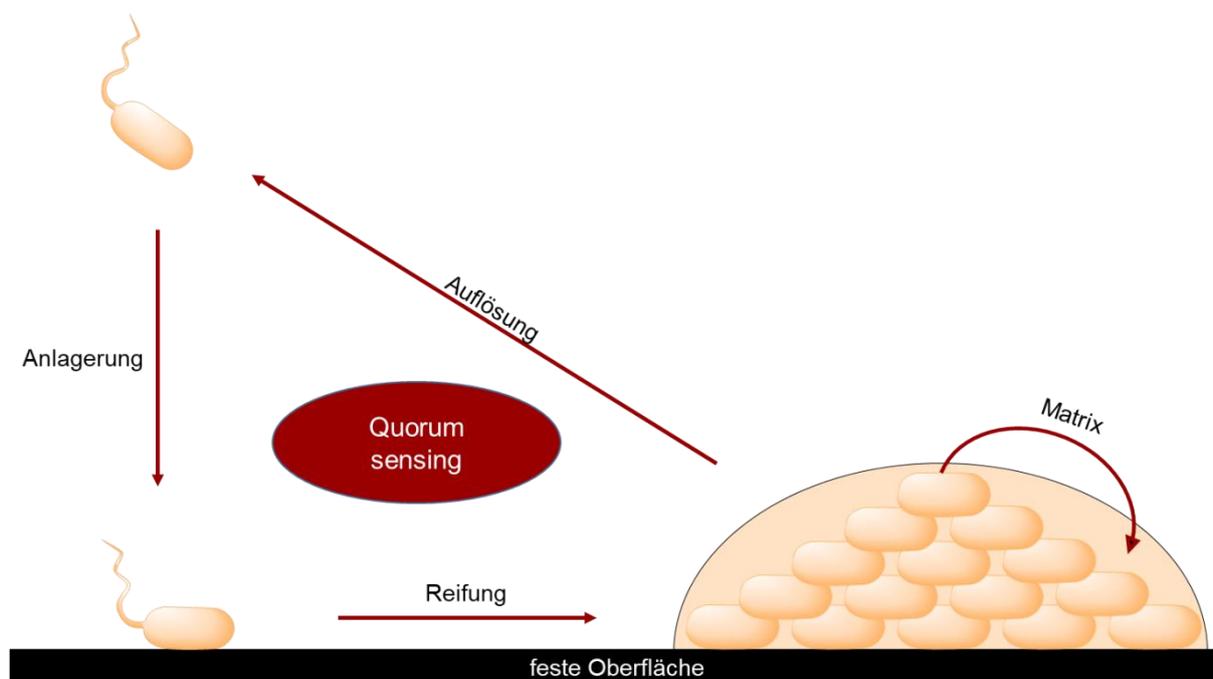
### 7. Biofilmbildung durch *Quorum sensing*

*Quorum sensing* beschreibt einen mikrobiellen Prozess, der physiologische Reaktionen in Abhängigkeit der Zellzahl auslöst. Der früheste als *Quorum sensing* klassifizierte Prozess war die Biolumineszenz (Fuqua *et al.*, 1994). Hierbei wird durch Mikroorganismen Lumineszenz initiiert. Die Lichtemission ist allerdings sehr energieaufwendig und die Lumineszenz einzelner Mikroorganismen wäre nicht wahrnehmbar. Daher ist es naheliegend, die Lumineszenz erst ab einer bestimmten Zellkonzentration zu initiieren. Diese Regulation abhängig von der Zellkonzentration erfolgt mithilfe von *Quorum sensing*-Mechanismen. Mittlerweile wurden auch andere, von *Quorum sensing* beeinflusste Prozesse entdeckt. Darunter zum Beispiel die Produktion von Pathogenitätsfaktoren und biofilminduzierenden Stoffen. In Gram-negativen Mikroorganismen haben *Quorum sensing*-Systeme meist vier gemeinsame Eigenschaften. Zunächst bestehen *Quorum sensing*-Moleküle meist aus Acyl-Homoserinlactonen oder aus S-Adenosylmethionin. Des Weiteren können *Quorum sensing*-Moleküle häufig bakterielle Membranen durch Diffusion passieren. Drittens wird durch *Quorum sensing*-Moleküle überwiegend die Expression einer Vielzahl von Genen beeinflusst und zuletzt führt *Quorum sensing* zu einer Autoinduktion von Genen, welche für die Synthese der Botenstoffe nötig sind (Papenfort and Bassler, 2016). Allerdings sind auch einige *Quorum sensing*-Mechanismen bekannt, die diese vier Eigenschaften nicht aufweisen. So nutzt zum Beispiel *Shewanella baltica* Diketopiperazine als *Quorum sensing*-Moleküle. Diketopiperazine sind eine Gruppe von Molekülen, welche zuvor der Interspezies-Kommunikation zugeschrieben wurde (de Carvalho and Abraham, 2012). Dennoch konnten Zhu und Kolleg:innen nachweisen, dass Diketopiperazine auch einen Einfluss auf die Biofilmbildung von *S. baltica* haben (Zhu *et al.*, 2020).

Bei der Regulation der Biofilmbildung können *Quorum sensing*-Moleküle bereits im frühen Stadium der Biofilmbildung, bei der Adhäsion an Oberflächen, einen regulatorischen Einfluss haben (Abbildung 4) (Irie and Parsek, 2008). Durch die Lebensweise als Biofilm können sich Mikroorganismen effektiver vor schädlichen Umwelteinflüssen schützen. Das funktioniert aber erst ab einer hohen Zellkonzentration, da die Mikroorganismen erst dann in der Lage sind sich durch Spezialisierung und genug EPS von schädlichen Umwelteinflüssen zu isolieren. Labbate und Kolleg:innen konnten etwa zeigen, dass die Induktion des *Quorum sensing* Systems *swr* in *Serratia liquefaciens* zu einer erhöhten Biofilmbildung führt (Labbate *et al.*, 2004).

## Einleitung

Neben der Adhäsion von Biofilmen können *Quorum sensing*-Systeme auch bei der Maturation oder der Auflösung des Biofilms eine Rolle spielen (Abbildung 4). So reguliert das *Quorum sensing*-System *pel* in *Pseudomonas aeruginosa* die EPS-Produktion des sich entwickelnden Biofilms (Sakuragi and Kolter, 2007).



**Abbildung 4: Einflussmöglichkeiten von *Quorum sensing* auf die Biofilmbildung.** Der Biofilm kann bereits in der Anlagerung, erst in der Reifung, bei der Produktion der EPS oder bei der Auflösung durch *Quorum sensing*-Signale beeinflusst werden. Die mögliche Einflussnahme von *Quorum sensing*-Molekülen ist durch rote Pfeile gezeigt (modifiziert nach Irie und Parsek, 2008).

In *S. oneidensis* ist bisher noch kein relevantes *Quorum sensing*-System bekannt. Allerdings wurde beobachtet, dass durch die Zugabe von geringen Mengen Riboflavin die Biofilmbildung positiv beeinflusst werden kann (Bao *et al.*, 2016; Arinda *et al.*, 2019). Dies legt die Vermutung nahe, dass Riboflavin als *Quorum sensing*-Molekül in *S. oneidensis* fungiert. Diese Vermutung wird in dieser Arbeit genauer untersucht und die Funktionsweise von Riboflavin als *Quorum sensing*-Molekül aufgeklärt.

### 8. Biofilmbildung von *S. oneidensis* in bioelektrochemischen Systemen

Die Regulation der Biofilmbildung in *S. oneidensis* variiert stark je nach Wachstumsbedingungen. Da die Anwendung in MEZ nur unter anoxischen Bedingungen möglich ist, wird im folgenden Abschnitt die Regulation der Biofilmbildung von *S. oneidensis* unter anoxischen Bedingungen genauer betrachtet.

## Einleitung

Das Wissen über die Biofilmproduktion von *S. oneidensis* unter anoxischen Bedingungen ist allerdings eher gering und es wird allgemein angenommen, dass Wildtyp (WT)-Stämme unter anoxischen Bedingungen nur dünne oder einschichtige Biofilme produzieren (Malvankar and Lovley, 2012). Cao und Kolleg:innen untersuchten das EPS-Material von *Shewanella* sp. HRCR-1-Biofilmen und beobachteten eine Mischung aus Proteinen, Polysacchariden, Nukleinsäuren, Fettsäuren und Membranlipiden (Cao *et al.*, 2011). Die Autor:innen verglichen auch die Zusammensetzung von lose gebundener EPS mit fester an die Zelloberfläche gebundener EPS. Dabei entdeckten sie ein höheres Verhältnis von Polysacchariden zu Proteinen in der locker gebundenen Fraktion. Darüber hinaus konnten in der Analyse MtrC- und OmcA-Homologe in der gebundenen EPS nachgewiesen werden, während nur das OmcA-Homolog im locker gebundenen Material nachgewiesen werden konnte (Cao *et al.*, 2011). In einer nachfolgenden Studie wurde gezeigt, dass OmcA ein wichtiger Faktor in Biofilmen ist, die auf Hämatit wachsen. OmcA scheint also für einen effizienten Elektronentransfer innerhalb reifer Biofilme notwendig zu sein, was für eine mögliche Funktion als leitende Komponente der extrazellulären Matrix spricht (Mitchell *et al.*, 2012). In einer Reihe von Studien wurde die Korrelation zwischen EPS und der Stromproduktion in BES nachgewiesen. In Selektionsstudien mit *S. oneidensis* in einem BES zeigte sich, dass Mutanten mit geringerer Kapselbildung mehr Strom produzieren (Kouzuma *et al.*, 2014). Tatsächlich wurde beobachtet, dass die Entfernung von EPS-Material aus *S. oneidensis*-Zellen zu höheren Stromdichten in BES führen kann, was auf eine teilweise isolierende Funktion von EPS zurückzuführen sein könnte (Gao *et al.*, 2019). Auf den ersten Blick konträr zu den Studien, welche einen Zusammenhang zwischen weniger EPS und einer gesteigerten Stromdichte herstellen, ist die Studie von Liu und Kolleg:innen. Die Autoren exprimierten die Diguanylatzyklase *ydeH* aus *E. coli* in *S. oneidensis* mit dem Ziel, die zelluläre zyklische di-GMP-Konzentration zu erhöhen und beobachteten höhere Zelldichten auf den Elektroden und fast dreimal mehr Strom (Liu *et al.*, 2015). Neben der Expression von *ydeH* gibt es noch weitere Ansätze, die Biofilmbildung unter anoxischen Bedingungen durch eine erhöhte zyklische di-GMP-Konzentration zu verstärken. So zeigten Chao und Kolleg:innen einen Zusammenhang zwischen der Deletion von *pdeB* und einer erhöhten zyklischen di-GMP-Konzentration. Auch hier hatte die Erhöhung der zyklischen di-GMP-Konzentration eine gesteigerte Biofilmbildung zur Folge (Chao *et al.*, 2013). Zusätzlich zur erhöhten Biofilmbildung scheinen erhöhte zyklische di-GMP-Konzentrationen auch die Expression von *c*-Typ Cytochromen zu steigern. Dies zeigte eine Studie von Ng und Kolleg:innen. In der Studie wurde eine zyklische di-GMP-Synthase überexprimiert, was zu einer erhöhten Biofilmbildung und einer erhöhten Expression von

## Einleitung

*cymA*, *mtrA*, *mtrB*, *mtrC* und *omcA* führte. Die Überexpression der Gene des EET führten zu einer erhöhten Eisen(III)-Reduktionrate (Ng *et al.*, 2020).

Offenbar kann sich eine erhöhte Biofilmbildung sowohl positiv als auch negativ auf die Stromdichte in BES auswirken. Dies ist vermutlich auf die unterschiedliche Zusammensetzung des EPS-Materials als Reaktion auf verschiedene Umwelt- oder Regulationsfaktoren zurückzuführen. Diese Hypothese wird auch durch die Studie von Bursac und Kolleg:innen unterstützt. Hier wurde durch die Deletion des Lambda-Phagen eine erhöhte Zellzahl auf der Anode festgestellt. Mit der um den Faktor 2,3 erhöhten Zellzahl stieg in diesem Fall auch die Stromdichte um den Faktor 1,34 (Bursac *et al.*, 2017). Ebenso zeigt die Überexpression von *bolA* eine verstärkte Biofilmbildung einhergehend mit einer erhöhten Stromdichte (Silva *et al.*, 2020). BolA ist ein Transkriptionsfaktor, welcher in *E. coli* die Zellform reguliert (Aldea *et al.*, 1988). Des Weiteren wurde bereits gezeigt, dass *bolA* die Biofilmbildung in *E. coli* steigert und damit den Wechsel zwischen planktonischer und sessiler Lebensweise induziert. In *S. oneidensis* scheint *bolA* eine ähnliche Funktion zu erfüllen, auch wenn der Effekt einer *bolA*-Überexpression in *S. oneidensis* vergleichsweise gering ist (Silva *et al.*, 2020).

Da die Biofilmbildung in *S. oneidensis* sehr vielschichtig ist, kann die Induktion desselben Gens unter verschiedenen Bedingungen andere Auswirkungen haben. Dies macht eine gezielte Modifikation hin zu einem konduktiven Biofilm sehr komplex. Daher wird in dieser Arbeit ein anderer Ansatz gewählt. Statt einer gezielten Modifikation einzelner Gene sollte der Organismus über eine Langzeitadaptation an die gewünschten Bedingungen in BES angepasst und durch die Wahl der Selektionsmethode zur Biofilmbildung geführt werden. Dank der genetischen Instabilität von *S. oneidensis* ist der Organismus sehr gut in der Lage, sich durch Mutationen an neue Umweltbedingungen anzupassen (Clark *et al.*, 2015; Sekar *et al.*, 2016). Diese Eigenschaft soll in der Adaptation genutzt werden um einen optimierten Produktionsstamm mit effizienter und konduktiver Biofilmbildung zu erhalten.

### **9. Die Funktion von Riboflavin in *S. oneidensis***

Riboflavin ist ein von *S. oneidensis* synthetisiertes und sekretiertes Flavin. Zur Synthese von Riboflavin sekretiert der Organismus zunächst Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) aus dem Cytoplasma über das spezifische Transportprotein Bfe in das Periplasma. Im Periplasma wird FAD als Cofaktor verschiedener Enzyme verwendet und zu einem Teil durch die periplasmatische 5'-Nuklease UshA in Flavin-Mononukleotid (FMN) und Adenosinmonophosphat (AMP) umgewandelt (Covington *et al.*, 2010). Unter planktonischen Bedingungen ist FMN das häufigste Flavin in *S. oneidensis*-Kulturen, gefolgt von deutlich

## Einleitung

geringeren Mengen Riboflavin (von Canstein *et al.*, 2008; Covington *et al.*, 2010; Kotloski and Gralnick, 2013). Die Umwandlung von FMN zu Riboflavin erfolgt nach heutigem Wissensstand spontan außerhalb der Mikroorganismen (Covington *et al.*, 2010). Sowohl FMN als auch Riboflavin können in löslichem Zustand als Elektronenshuttle die Elektronenübertragung auf unlösliche Elektronenakzeptoren übernehmen. Des Weiteren können FMN und Riboflavin als Cofaktor von äußeren Membrancytochromen den Elektronentransfer auf extrazelluläre Elektronenakzeptoren über die Bildung von Semichinonen um ein Vielfaches beschleunigen (Okamoto *et al.*, 2013; Okamoto *et al.*, 2014a; Okamoto *et al.*, 2014b; Xu *et al.*, 2016). Die Funktion als Cofaktor von Flavinen ist nicht nur in *S. oneidensis* bekannt, sondern auch aus anderen elektroaktiven Mikroorganismen wie *G. sulfurreducens* (Okamoto *et al.*, 2014b; Thirumurthy and Jones, 2020).

Neben der Funktion als Elektronenshuttle und Cofaktor scheint Riboflavin auch einen positiven Effekt auf die Biofilmbildung von *S. oneidensis* zu haben. Sowohl Bao und Kolleg:innen als auch Arinda und Kolleg:innen beobachteten eine erhöhte Biofilmbildung von *S. oneidensis* durch die Zugabe geringer Mengen Riboflavin in BES (Bao *et al.*, 2016; Arinda *et al.*, 2019). Die erhöhte Biofilmbildung kann durch zwei Gründe hervorgerufen werden. Zum einen ist es denkbar, dass die Zugabe eines Elektronenshuttles das Wachstum von Biofilm in größerer Entfernung zur Anode ermöglicht. Zum anderen könnte externes Riboflavin die Biofilmbildung initiieren. In diesem Fall würde die erhöhte Zelldichte auf der Anode zu höheren Stromdichten führen. Die zweite Hypothese wird in dieser Arbeit genauer untersucht und die Bedeutung von Riboflavin als Biofilm-induzierendes *Quorum sensing*-Molekül genauer betrachtet.

### **10. Das Produktspektrum von *S. oneidensis* und dessen Erweiterung um Acetoin**

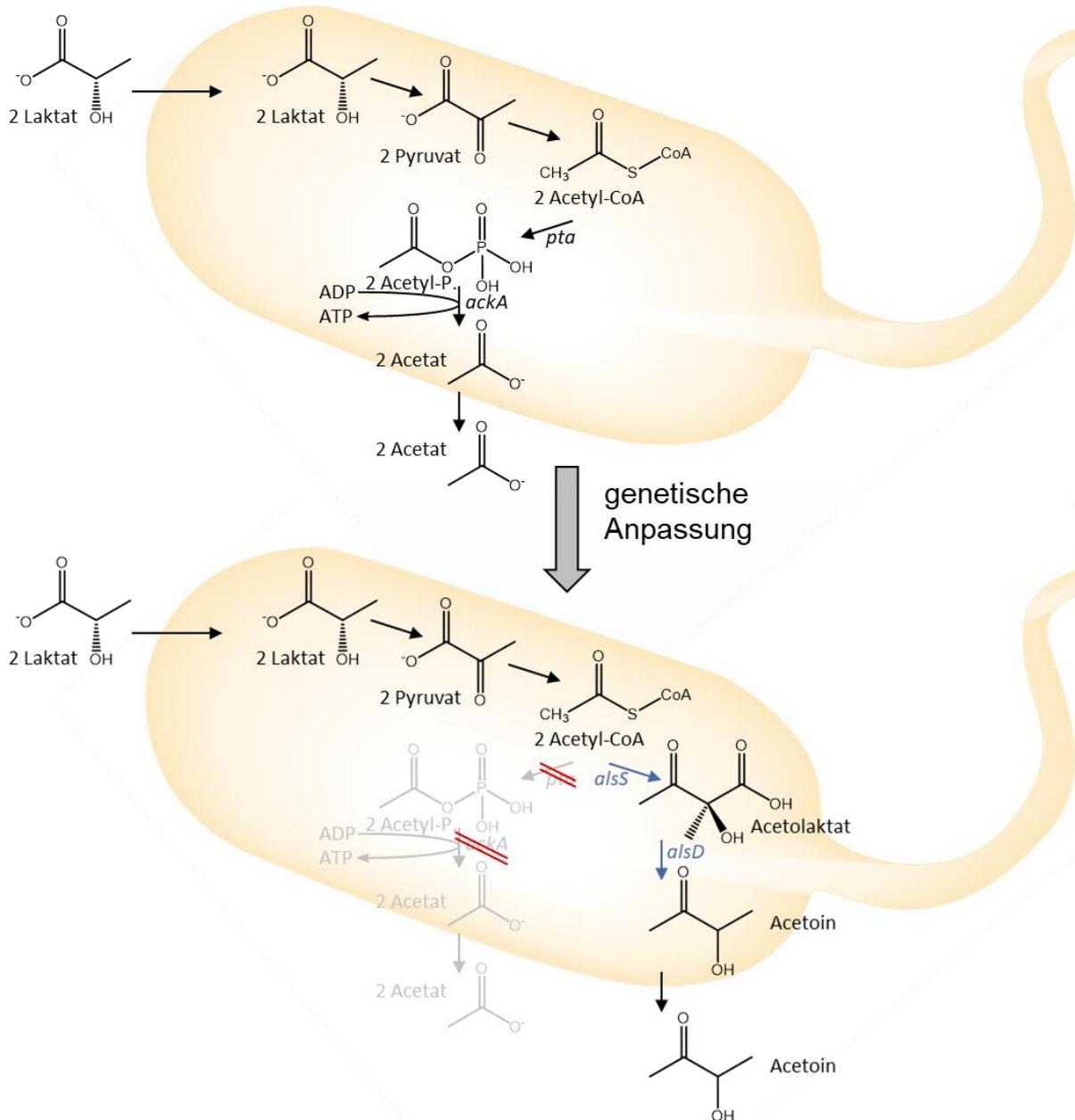
Bei der mikrobiellen Produktion von Basischemikalien ist die Wahl des Produktes entscheidend. Prinzipiell können durch Mikroorganismen zahlreiche Basischemikalien produziert werden (Philipp *et al.*, 2020). Relevant sind hierbei lediglich der native Metabolismus des Mikroorganismus und die Möglichkeit der heterologen Expression der benötigten Synthesegene. Bei der Verwendung von *S. oneidensis* als Produktionsorganismus wird zunächst Acetat als natives Endprodukt synthetisiert. Da Acetat aber eine geringe industrielle Relevanz hat, kann die Produktion von Acetat durch die Deletion der Acetatkinase (*ackA*) und der Phosphotransacetylase (*pta*) verhindert werden (Bursac *et al.*, 2017). Es kommt dann zu einer Akkumulation von Pyruvat als zentrales Stoffwechselendprodukt. Aus Pyruvat wiederum können zahlreiche industriell verwertbare Basischemikalien synthetisiert werden. Beispiele für solche Basischemikalien ausgehend von Pyruvat sind Acetoin, Laktat, und Malat

## Einleitung

(Nakagawa *et al.*, 2015; Bursac *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2020). Da die Produktion von Acetoin bereits erfolgreich in *S. oneidensis* etabliert wurde, soll der Prozess in dieser Arbeit optimiert werden. Hierbei liegt ein besonderer Schwerpunkt auf einer Verbesserung der Raum-Zeit-Ausbeute. Bursac und Kolleg:innen zeigten bereits 2017 eine funktionale Produktion von Acetoin durch *S. oneidensis* in BES. Durch die heterologe Expression einer Acetolaktatsynthase (*alsS*) und einer Acetolaktatdecarboxylase (*alsD*) aus *Bacillus subtilis* ist *S. oneidensis* in der Lage ausgehend von Pyruvat über Acetyl-CoA und Acetolaktat Acetoin zu bilden (Abbildung 5). Hierbei wurde eine Kohlenstoffeffizienz von 86 % erreicht. Allerdings ist die Raum-Zeit-Ausbeute lediglich bei wenigen Milligramm pro Liter und Stunde. Bereits etablierte oxische Herstellungsverfahren erreichen jedoch Raum-Zeit-Ausbeuten von einigen Gramm pro Liter und Stunde (Yang *et al.*, 2017). Um eine anoxische Produktion von Acetoin mithilfe von *S. oneidensis* in BES industriell zu etablieren, besteht demnach Optimierungsbedarf.

Ein Nachteil der Produktion von Acetoin statt Acetat durch *S. oneidensis* ist die geringere Verfügbarkeit von ATP als zentralem Energieträger in bakteriellen Zellen. Durch die Deletion von *ackA* wird die Umwandlung von Acetylphosphat zu Acetat verhindert. Die Umwandlung von Acetylphosphat zu Acetat generiert allerdings neben Acetat auch ATP. Durch die Produktion von Acetoin als alternativem Endprodukt wird dagegen kein ATP synthetisiert (Abbildung 5). Durch die verringerte ATP-Produktion kommt es besonders unter anoxischen Produktionsbedingungen für den Organismus zu einem Wachstumsnachteil. Um dieses Defizit ausgleichen zu können, wird in dieser Arbeit Glukose als Substrat etabliert (siehe I. 11. Das Substratspektrum von *S. oneidensis* und dessen Erweiterung um Glukose). Durch die Verwendung von Glukose kann *S. oneidensis* wieder ein ATP pro Glukose synthetisieren, wodurch auch unter anoxischen Bedingungen Wachstum ermöglicht wird. Die Verwendung von Glukose als Substrat wirkt sich allerdings auch auf die Auswahl der verwendeten Promotoren vor den heterolog exprimierten Genen aus. Das von Bursac und Kolleg:innen etablierte Plasmid nutzt einen Arabinose-Promotor vor den Genen zur Acetoinproduktion (Bursac *et al.*, 2017). Es ist allerdings bekannt, dass Arabinose-Promotoren durch die Zugabe von Glukose reprimiert werden (Guzman *et al.*, 1995). Um dies zu verhindern, wurde als Promotor vor den Genen zur Acetoinproduktion sowie vor den Genen zum Glukoseabbau der native Promotor des *c*-Typ Cytochroms *cctA* gewählt.

## Einleitung



**Abbildung 5: Erweiterung des Produktspektrums von *S. oneidensis* um Acetoin.** Durch die Deletion von *pta* und *ackA* wird zunächst die Bildung von Acetat ausgehend von Pyruvat verhindert. Durch die heterologe Expression von *alsS* und *alsD* wird die Synthese von Acetoin ermöglicht.

### 11. Das Substratspektrum von *S. oneidensis* und dessen Erweiterung um Glukose

Ein Nachteil von *S. oneidensis* als Produktionsorganismus von Basischemikalien stellt sein enges Substratspektrum dar. Nativ ist der Mikroorganismus lediglich in der Lage Laktat, N-Acetylglucosamin und einige Gärungsendprodukte, wie Formiat und Pyruvat, in BES zu nutzen (Lovley *et al.*, 1998; Meshulam-Simon *et al.*, 2007; Hunt *et al.*, 2010). Für eine nachhaltige Produktion von Basischemikalien ist die Verwendung von nachhaltigen Substraten aber unumgänglich. Daher soll in dieser Arbeit die Verwendung von Glukose als Substrat optimiert werden. Glukose ist ein weit verbreitetes natürliches Speicherprodukt und kann darüber hinaus

## Einleitung

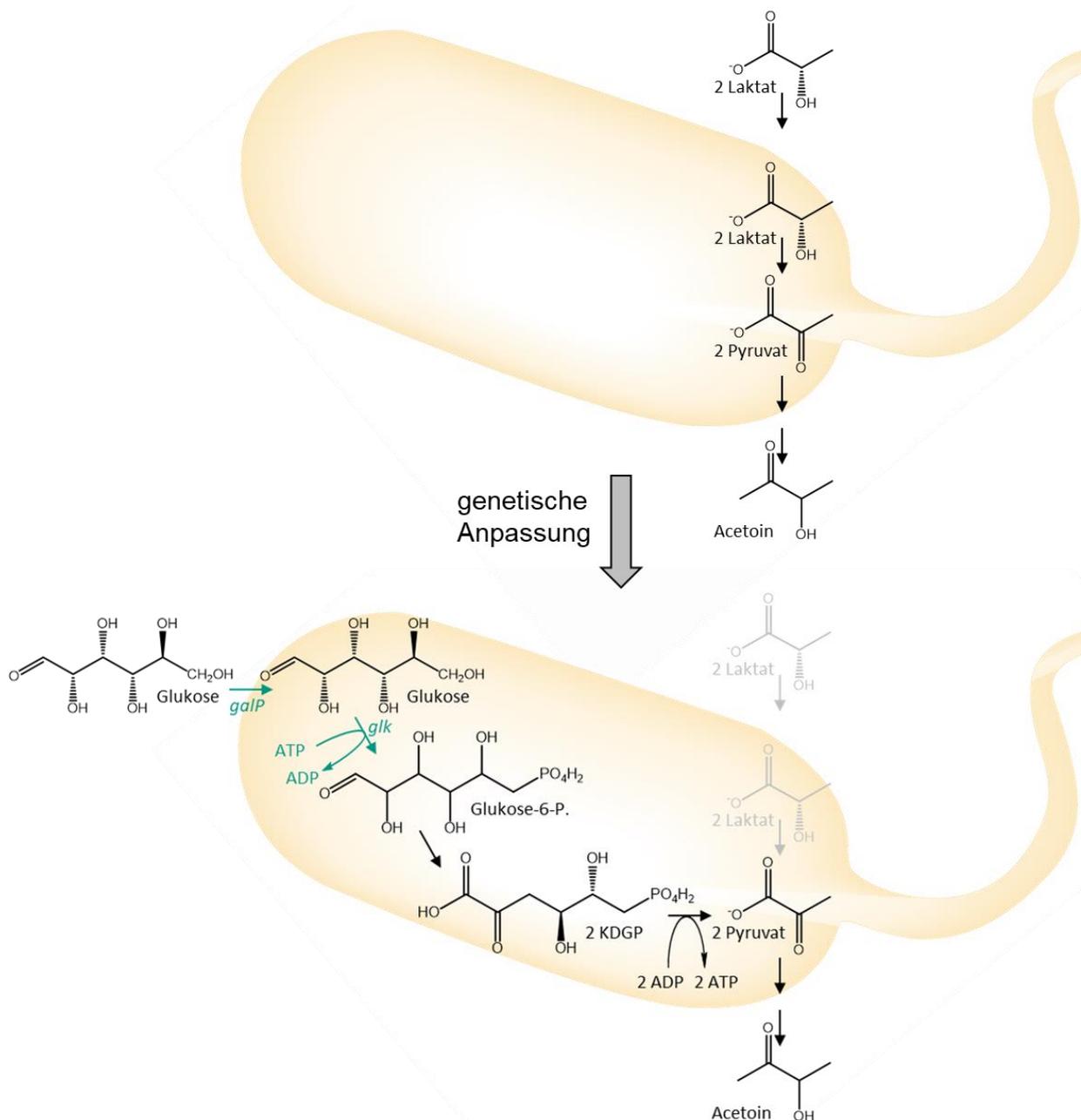
durch die Spaltung von Cellulose gewonnen werden. Cellulose wiederum fällt in kommunalen Abwässern in großen Mengen an und wird bis dato hauptsächlich thermisch verwertet (Champagne and Li, 2009). Durch die Verwendung von Cellulose-Untereinheiten von *S. oneidensis* zur Produktion von Basischemikalien könnte der Organismus einen wichtigen Beitrag zu einer ressourcenschonenden Kreislaufwirtschaft leisten.

Im Allgemeinen ist *S. oneidensis* in der Lage Glukose-6-Phosphat über den Entner-Doudoroff-Weg zu Pyruvat umzuwandeln (Chubiz and Marx, 2017). Um einen Abbau von Glukose zu ermöglichen werden also lediglich ein Glukose-Importer und eine Glukokinase benötigt (Rodionov *et al.*, 2010). Hierbei hat sich die heterologe Expression der Enzyme aus *E. coli* bereits in mehreren Studien bewährt (Choi *et al.*, 2014; Nakagawa *et al.*, 2015). Durch den Glukose-Importer GalP kann Glukose in das Cytoplasma transportiert werden, wo es dann von der Glukokinase Glk in Glukose-6-Phosphat umgewandelt werden kann. Der Abbau von Glukose durch die heterologe Expression von *galP* und *glk* wird in Abbildung 6 gezeigt. Es wurde gezeigt, dass es durch die Verwendung von Glukose als Substrat in BES zu einem Elektronenüberschuss kommen kann. Dies ist dann der Fall, wenn die Elektronen nicht schnell genug auf einen Elektronenakzeptor übertragen werden können. Der Überschuss an Elektronen führt zu einer Umsetzung von Pyruvat zu Laktat als Elektronenspeicher (Kasai *et al.*, 2019). Für diese Reaktion kann *S. oneidensis* zwei Laktatdehydrogenasen nutzen. Die Laktatdehydrogenase *ldhA* katalysiert die Bildung von Laktat unter Regeneration von NAD<sup>+</sup>, während die Laktatdehydrogenase *dld-II* mit dem Menaquinonpool interagiert. Während die Expression und damit die Laktatbildung von *dld-II* durch das Elektrodenpotential beeinflusst werden kann, ist die Laktatbildung durch *ldhA* potentialunabhängig (Pinchuk *et al.*, 2008; Kasai *et al.*, 2019). Um die Laktatakkumulation zu reduzieren und höhere Konzentrationen des gewünschten Endprodukts Acetoin zu gewinnen, wurden die Gene für den Glukose-Import und den Glukose-Abbau in den Lokus der Laktatdehydrogenase *ldhA* im *S. oneidensis*-Genom eingebracht. Dadurch wurde die Laktatdehydrogenase *ldhA* deletiert.

Neben dem Aspekt der Nachhaltigkeit bringt Glukose als Substrat für *S. oneidensis* einen weiteren Vorteil unter anoxischen Bedingungen. Durch die Verwendung von Glukose statt Laktat als Substrat kann der Organismus ein ATP als Energiespeicherstoff bilden (Pinchuk *et al.*, 2008; Hunt *et al.*, 2010; Nakagawa *et al.*, 2015). Dies ist besonders bei Stämmen relevant, welche nicht mehr in der Lage sind, Acetat über die Substratstufenphosphorylierung zu bilden. Durch die Umwandlung von Pyruvat zu Acetat erhält *S. oneidensis* normalerweise 2 ATP. Deletiert man diesen Stoffwechselweg zugunsten eines anderen, industriell wertvolleren

## Einleitung

Endprodukts, so wird dem Organismus auch die Möglichkeit der ATP-Gewinnung durch die Substratstufenphosphorylierung genommen. Durch die Verwendung von Glukose als Substrat kann der Mikroorganismus diesen Nachteil teilweise ausgleichen. Die Umwandlung von Glukose zu Glukose-6-Phosphat benötigt zwar zunächst ein ATP, in der weiteren Umwandlung über den Entner-Doudoroff-Weg werden allerdings zwei ATP gewonnen. Dies lässt dem Mikroorganismus also ein ATP als Energieträger für zelluläre Prozesse.



**Abbildung 6: Erweiterung des Substratspektrums von *S. oneidensis* um Glukose.** Durch die Expression von GalP kann Glukose in die Zelle transportiert werden und im Folgenden durch Glk zu Glukose-6-Phosphat umgesetzt werden. Glukose-6-Phosphat wird über den Entner-Doudoroff-Weg zu KDGP und schließlich zu Pyruvat umgesetzt.

### 12. Zielsetzung der Arbeit

Eine grundlegende Frage, die in dieser Arbeit untersucht werden sollte, war wie die Biofilmbildung in *S. oneidensis* unter anoxischen Bedingungen reguliert wird. Hierbei war von besonderem Interesse, welchen Einfluss Riboflavin auf die Biofilmbildung hat und welche Mechanismen der Riboflavin-induzierten Biofilmbildung zu Grunde liegen. Um die molekularen Mechanismen hinter der Riboflavin-induzierten Biofilmbildung zu verstehen, sollte zunächst die Transkriptom-Reaktion auf die Zugabe von Riboflavin untersucht werden. Im Anschluss sollten die durch die Zugabe von Riboflavin induzierten und reprimierten Gene genauer analysiert und deren Einfluss auf die Stromdichte und Biofilmbildung von *S. oneidensis* in BES betrachtet werden. Um zu klären, ob Riboflavin unter natürlichen Bedingungen einen Einfluss auf die Biofilmbildung von *S. oneidensis* haben kann, sollte die minimal nötige Riboflavin-Konzentration zur Induktion der Biofilmbildung sowie die Riboflavin-Produktion von *S. oneidensis* betrachtet werden.

Der zweite Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Optimierung von *S. oneidensis* als Produktionsorganismus. Hierbei stand im Mittelpunkt, wie die Umsatzraten von *S. oneidensis* in BES bei Verwendung von Glukose als Substrat gesteigert werden können. Des Weiteren sollte eine maximierte Raum-Zeit-Ausbeute von Acetoin als Endprodukt erzielt werden. Um Glukose als Substrat zu etablieren, sollten die Gene für den Glukose-Importer GalP und die Glukokinase Glk in das *S. oneidensis* Genom eingebracht werden. Zur Erweiterung des Produktspektrums um Acetoin sollten zusätzlich das Acetolaktatsynthase-Gen *alsS* sowie das Acetolaktatdecarboxylase-Gen *alsD* in *S. oneidensis* eingebracht werden. Ebenso sollte die Laktatdehydrogenase *ldhA* deletiert werden, um die Produktion von Laktat bei einem Elektronenüberschuss zu vermeiden. Mit dem generierten Produktionsstamm sollten nun die Schlüsselpunkte einer effizienten Produktion von Plattformchemikalien untersucht werden. Dabei sollten mehrere Punkte adressiert werden. Zum einen war von Interesse, durch welche Schlüsselgene die Aufnahme und der Abbau von Glukose als Substrat beeinflusst werden. Ebenso sollte untersucht werden, wo Engpässe in der Umsatzrate von *S. oneidensis* in BES bestehen und welche Gene einen Einfluss auf die Biofilmbildung unter den gewählten Bedingungen haben. Zudem sollte analysiert werden wo Engpässe bestehen, welche die Acetoin Produktion limitieren.

## II. Material und Methoden

### 1. Mikroorganismen und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen sind in Tabelle 1 aufgeführt. Angegeben ist jeweils die Stammmnummer, der relevante Genotyp sowie die Referenz.

**Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.**

<b>Stamm</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Referenz</b>
7	<i>S. oneidensis</i> MR-1 WT	(Venkateswaran <i>et al.</i> , 1999)
22	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	(Lutz and Bujard, 1997)
98	<i>E. coli</i> WM3064	W. Metcalf, Universität Illinois, Urbana
1038	<i>S. oneidensis</i> MR-1 $\Delta\lambda$ $\Delta$ <i>ackA pta</i>	(Bursać, 2015)
1336	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ pBADleer	Laura Philipp
1368	<i>S. oneidensis</i> MR-1 $\Delta$ <i>srtA</i>	Diese Arbeit / (Edel <i>et al.</i> , 2021)
1467	<i>S. oneidensis</i> MR-1 + pBAD <i>speC</i>	Diese Arbeit / (Edel <i>et al.</i> , 2021)
1759	<i>S. oneidensis</i> MR-1 $\Delta$ <i>speC</i> + pBADleer	Diese Arbeit / (Edel <i>et al.</i> , 2021)
1729	<i>S. oneidensis</i> MR-1 $\Delta\lambda\Delta$ <i>ackA pta</i> $\Delta$ <i>ldhA::P<sub>stc</sub>glk<sub>galP</sub></i> + pBAD <sub>P<sub>stc</sub>alsSD</sub> Ausgangsstamm	Diese Arbeit
1730	<i>S. oneidensis</i> MR-1 $\Delta\lambda\Delta$ <i>ackA pta</i> $\Delta$ <i>ldhA::P<sub>stc</sub>glk<sub>galP</sub></i> + pBAD <sub>P<sub>stc</sub>alsSD_4B</sub>	Diese Arbeit
1731	<i>S. oneidensis</i> MR-1 $\Delta\lambda\Delta$ <i>ackA pta</i> $\Delta$ <i>ldhA::P<sub>stc</sub>glk<sub>galP</sub></i> + pBAD <sub>P<sub>stc</sub>alsSD_6A</sub>	Diese Arbeit
1732	<i>S. oneidensis</i> MR-1 $\Delta\lambda\Delta$ <i>ackA pta</i> $\Delta$ <i>ldhA::P<sub>stc</sub>glk<sub>galP</sub></i> + pBAD <sub>P<sub>stc</sub>alsSD_10A</sub>	Diese Arbeit
1760	<i>S. oneidensis</i> + pBAD <i>wbpAwbpP</i>	Diese Arbeit / (Edel <i>et al.</i> , 2021)
1761	<i>S. oneidensis</i> MR-1 + pBAD <i>wbpP</i>	Diese Arbeit / (Edel <i>et al.</i> , 2021)
1754	<i>S. oneidensis</i> MR-1 $\Delta\lambda\Delta$ <i>ackA pta</i> $\Delta$ <i>ldhA::P<sub>stc</sub>glk<sub>galP</sub></i> + pBAD <sub>P<sub>stc</sub>alsSD_6C</sub>	Diese Arbeit

- 1755** *S. oneidensis* MR-1  $\Delta\lambda\Delta ackA pta \Delta ldhA::P_{stc}glk_{galP}$  + Diese Arbeit  
pBAD<sub>P<sub>stc</sub>alsSD\_9G</sub>
- 1756** *S. oneidensis* MR-1  $\Delta\lambda\Delta ackA pta \Delta ldhA::P_{stc}glk_{galP}$  + Diese Arbeit  
pBAD<sub>P<sub>stc</sub>alsSD\_9F</sub>
- 

## 2. Chemikalien und Enzyme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien stammen, sofern nicht anders angegeben, von AppliChem (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main, Deutschland), Promega (Mannheim, Deutschland), PCR Biosystems (London; Großbritannien), Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland) oder Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA).

## 3. Medien und Kultivierung

Alle verwendeten Medien und Lösungen wurden mit zweifach deionisiertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) (TKA MicroPure, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) hergestellt und vor Gebrauch sterilisiert. Das Sterilisieren erfolgte entweder durch Autoklavieren (Systec VE-150, Linden, Deutschland) oder im Fall von hitzelabilen Lösungen durch Filtration (0,22 µm Spritzenfilter, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland). Der pH-Wert wurde bei Minimalmedien auf pH = 7,4 eingestellt. Falls nötig wurden die Medien nach Sterilisation komplementiert und mit Selektionsmarkern versetzt. Die Lösungen zur Komplementation und deren finale Konzentration sind in Tabelle 2 aufgeführt.

**Tabelle 2: Verwendete Komplementationslösungen.**

<b>Komponente</b>	<b>Finale Konzentration</b>
DAP	0,3 mM
Kanamycin	50 µg/ml
Arabinose	100 µM
Glukose	50 mM
Sukrose	10 % (w/v)

Zur Kultivierung auf festem Medium wurde das jeweilige Medium mit 2 % Agar-Agar (w/v) versetzt. Um den Agar-Agar zu lösen, wurde das Medium aufgekocht und anschließend vor der Zugabe hitzelabiler Substanzen auf 60 °C temperiert.

Die Kultivierung unter anoxischen Bedingungen erfolgte in Flüssigmedien in Laborflaschen (Duran, Mainz, Deutschland), welche durch Kautschukstopfen gasdicht verschlossen wurden. Die Anaerobisierung der gasdicht verschlossenen Flaschen erfolgte durch zyklisches Begasen mit Stickstoff und Vakuumieren für je 2 Minuten und mindestens 20 Zyklen.

Mikroorganismen in Flüssigmedien wurden unter stetigem Schütteln (180 Umdrehungen pro Minute (*rounds per minute*, rpm) bei 30 °C (*S. oneidensis*) oder 37 °C (*E. coli*) inkubiert. Mikroorganismen auf festen Medien wurden ohne Schütteln inkubiert. Das Wachstum wurde photometrisch ( $\lambda = 600$  nm) mithilfe eines SPECTRONIC Genesys 20 Photospektrometers (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nach Bedarf überwacht.

### 3.1. Medien zur Kultivierung

Zur Kultivierung flüssiger Vorkulturen und von Stämmen zur Elektroporation wurde LB-Medium (*lysogeny broth*) verwendet. Die Regeneration nach erfolgter Elektroporation wurde ebenfalls in LB-Medium durchgeführt. Die Zusammensetzung des LB-Mediums ist in Tabelle 3 aufgeführt.

**Tabelle 3: Zusammensetzung des LB-Mediums.**

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

Zur anoxischen Kultivierung sowie zur Kultivierung unter definierten Wachstumsbedingungen wurde M4-Medium verwendet. Die Zusammensetzung des Mediums kann Tabelle 4 entnommen werden. Als Elektronenakzeptor wurde unter anoxischen Bedingungen 100 mM Fumarat verwendet. Als Elektronendonator wurden 70 mM Laktat oder 50 mM Glukose verwendet. Bei einer Kultivierung in BES wurde kein Elektronenakzeptor zugesetzt, da hier die Anode als Elektronenakzeptor diente. Die Zusammensetzung der zugegebenen Spurenelemente kann Tabelle 5 entnommen werden.

**Tabelle 4: Zusammensetzung des M4-Mediums.**

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,22 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,09 g
HEPES	1,41 g
NaHCO <sub>3</sub>	0,17 g
NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	1,19 g
NaCl	8,77 g
Caseinhydrolysat	1 g
Spurenelemente	10 ml
MgSO <sub>4</sub> (1 M)	1 ml
CaCl <sub>2</sub> (0,1 M)	1 ml

**Tabelle 5: Zusammensetzung der 100x Spurenelementlösung.**

<b>Komponente</b>	<b>Menge [mg/l]</b>
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	119
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	5
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	351
Fe(II)Cl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	107,4
Mn(II)SO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	
Na <sub>2</sub> EDTA	2500
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	93,6
Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	28,3
NaCl	58,4
NiCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	119
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	30

### **3.2. Stammkonservierung**

Zur kurzfristigen Sicherung von Stämmen wurden diese auf Kulturplatten bei 30 °C (*S. oneidensis*) oder 37 °C (*E. coli*) kultiviert und anschließend bei 4 °C für maximal 2 Wochen gelagert.

Zur dauerhaften Konservierung von Bakterienstämmen wurde eine Gefrierkultur angelegt. Dazu wurden die Bakterien in LB-Medium kultiviert, in der exponentiellen Wachstumsphase mit 10 % Glycerin versetzt und in Kryogefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Im Anschluss wurden die Kulturen bei -80 °C gelagert.

## **4. Molekularbiologische Methoden**

### **4.1. Isolation von Nukleinsäuren**

#### **4.1.1. Isolation von Plasmid-DNA**

Die Isolation von Plasmid-DNA erfolgte mithilfe des *Wizard® SV Minipreps DNA Purification Systems* (Promega, Mannheim, Deutschland) nach Herstellerprotokoll. Zur Quantifizierung der DNA wurde die Probe mittels NanoDrop gemessen (siehe II.4.7. Quantifizierung von Nukleinsäuren).

#### **4.1.2. Isolation chromosomaler DNA**

Chromosomale DNA wurde mithilfe des *Wizard® Genomic DNA Purification KIT* (Promega, Mannheim, Deutschland) nach Standardprotokoll isoliert. Die Rehydrierung der chromosomalen DNA erfolgte dabei über Nacht bei Raumtemperatur (RT).

#### **4.1.3. Isolation der DNA von Anoden**

Nachdem ein BES-Experiment abgeschlossen war, wurden die Anoden aus dem System entfernt und bei -20 °C aufbewahrt. Zur Isolation der DNA von der Anode wurden diese aufgetaut und mithilfe eines Skalpell zerkleinert. Im Anschluss wurde jede Anode in 5 ml SLS-Puffer aus dem InnuPrep Stool DNA Kit (AnalytikJena, Jena, Deutschland) gegeben. Danach wurden die Proben jeweils 1 min durch vortexen gemischt und 15 min bei 95 °C im Wasserbad erhitzt. Anschließend wurde zweimal 1 ml der Lösung in ein Reagiergefäß überführt und nach Zentrifugation bei 8000 g für 2 min nach Herstellerangaben weiter verfahren. Die isolierte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

#### **4.1.4. Isolation von RNA**

Vor der RNA-Isolation zur cDNA Synthese wurden die jeweiligen Stämme unter den zu untersuchenden Bedingungen kultiviert. Zur Isolation wurden je 0,5 ml Bakteriensuspension

mit 1 ml *RNAprotect* (Qiagen, Aarhus, Dänemark) versetzt. Im Anschluss wurde die RNA-Isolation mithilfe des *RNeasy MiniKit* (Qiagen, Aarhus, Dänemark) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die finale Elution der RNA erfolgte in 50 µl RNase freiem ddH<sub>2</sub>O. Die Konzentration der RNA wurde mithilfe des NanoDrop bestimmt (siehe II.4.7 Quantifizierung von Nukleinsäuren).

Die Isolation von RNA zur anschließenden Transkriptomanalyse wurde von IMGGM (IMGGM Laboratories, Planegg, Deutschland) durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen im Vorfeld unter den zu untersuchenden Bedingungen kultiviert. Die planktonischen Zellen wurden in einer vorgekühlten Zentrifuge bei 6000 g pelletiert, das Pellet im Anschluss sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zum Versand aufbewahrt. Der Versand an IMGGM erfolgte auf Trockeneis.

#### 4.2. cDNA-Synthese

Nach der RNA-Isolation wurden zunächst DNA-Verunreinigungen mithilfe des *RNase-Free DNase Sets* (Qiagen, Aarhus, Dänemark) über Nacht entfernt. Im Anschluss daran wurden die Proben durch ein Agarosegel auf DNA-Verunreinigungen kontrolliert und mithilfe des *iScript<sup>TM</sup> Select cDNA Synthesis Kits* (Biorad, Feldkirchen, Deutschland) mit *random primern* nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist in Tabelle 6 zu finden. Das zur cDNA-Synthese verwendete Programm ist in Tabelle 7 aufgeführt.

**Tabelle 6: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur cDNA-Synthese.**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen [µl]</b>
RNA (50 -100 ng/µl)	2
5 x <i>iScript Select Reaction Mixr</i>	4
<i>random primer</i>	2
Reverse Transkriptase	1
ddH <sub>2</sub> O	11

**Tabelle 7: Inkubationsbedingungen zur cDNA-Synthese.**

Zeit [min]	Temperatur [°C]
60	42
5	25
30	42
5	5
∞	-20

### 4.3. Polymerase-Kettenreaktion

Die Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente erfolgte mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die hierfür verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 8 aufgeführt. Alle PCR-Reaktionen wurden in Thermocyclern (C1000 / S1000 / MJ Mini, BioRad, Feldkirchen, Deutschland) durchgeführt.

**Tabelle 8: Zur PCR verwendeten Oligonukleotide**

Num	Name	Sequenz	Verwendung
41	pMQ_Test_for	CTGGCGAAAGGGGGATGTG	Test-PCR in pMQ150
42	pMQ_Test_for	CATTAGGCACCCCAGGCTTTAC	Test-PCR in pMQ150
1194	pBAD_Test_for	GATTAGCGGATCCTACCTGAC	Test-PCR in pBAD202
1195	pBAD_Test_rev	CTTCATCCGCCAAAACAGC	Test-PCR in pBAD202
3521	<i>speC</i> _OL_pBAD_for	GTTTAAC TTTAAGAAGGAGATATACATACC ATGAGCCAATTTCAATCTATTG	Konstruktion von pBAD <i>speC</i>
3522	<i>speC</i> _OL_pBAD_rev	CCGCCAAAACAGCCAAGCTGGAGACCGTTT TTACAGATAGTAATCTTTCAGT	Konstruktion von pBAD <i>speC</i>
3523	<i>wbpP</i> _OL_pBAD_for	CTTTAAGAAGGAGATATACATACCATGACA CGTTACGAACAAATTA	Konstruktion von pBAD <i>wbpP</i>
3524	<i>wbpP</i> _OL_pBAD_rev	AGCCAAGCTGGAGACCGTTTTTATGCCAAA AACTCCTTG TAC	Konstruktion von pBAD <i>wbpP</i> und pBAD <i>wbpAwbpP</i>
3525	<i>wbpA</i> _OL_pBAD_for	CTTTAAGAAGGAGATATACATACCATGATG TTTGATGTAGTAAATGC	Konstruktion von pBAD <i>wbpAwbpP</i>
3526	<i>wbpA</i> _rev_OL_ <i>wbpP</i>	GTTTCGTAAACGTGTCATGTGAAATCCAATCA GAAGCAAG	Konstruktion von pBAD <i>wbpAwbpP</i>
3527	<i>wbpP</i> _for	ATGACACGTTACGAACAAATTA	Konstruktion von pBAD <i>wbpAwbpP</i>
3528	500up_ <i>speC</i> _OL_pM Q150_for	GATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGA TCTACTTCGACTCCAGTGAAGC	Konstruktion von pMQ150 500up 500 down <i>speC</i>
3529	500up_ <i>speC</i> _OL_500 down_ <i>speC</i> _rev	CTTTTTGTTGCCATTAAGCCAATGGGCCAG AGTCTCCTTTG	Konstruktion von pMQ150 500up 500 down <i>speC</i>
3530	500down_ <i>speC</i> _for	TTGGCTTAATGGCAACAAAAG	Konstruktion von pMQ150 500up 500 down <i>speC</i>
3531	500down_ <i>speC</i> _OL_ pMQ150_rev	CGGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGG CGTTAACAGACCCAATGCGT	Konstruktion von pMQ150 500up 500 down <i>speC</i>
3532	500up_ <i>srtA</i> _OL_pM Q150_for	CAGTGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGGCGA GCCTAAGGAGTTAGT	Konstruktion von pMQ150 500up 500 down <i>srtA</i>

## Material und Methoden

3533	500up_srtA_rev	CGAGCTCATCAATGGCTAAG	Konstruktion von pMQ150 500up 500 down <i>srtA</i>
3534	500down_srtA_OL_500up_srtA_for	CATTGATGAGCTCGACGGACGATAACGCGG CAGA	Konstruktion von pMQ150 500up 500 down <i>srtA</i>
3535	500down_srtA_OL_pMQ150_rev	TTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATC GACCGACGTAAAGACCAAC	Konstruktion von pMQ150 500up 500 down <i>srtA</i>
3536	Test_ΔspeC_for	GCCTAAGCGTAATGCCGA	Sequenzieren von <i>S. oneidensis</i> ΔspeC
3537	Test_ΔspeC_rev	TGCAAGAATTACCCTTTGCG	Sequenzieren von <i>S. oneidensis</i> ΔspeC
3538	Test_ΔsrtA_for	CGGTGCTGACCGATCTGCA	Sequenzieren von <i>S. oneidensis</i> ΔsrtA
3539	Test_ΔsrtA_rev	ACCAACTGGGCGATCAAGT	Sequenzieren von <i>S. oneidensis</i> ΔsrtA
751	qPCR_S.on_for	TATTCAAGTGCTTCTATTAG	Quantifizieren von <i>S. oneidensis</i> durch qPCR
752	qPCR_S.on_rev	AAGAACTTCTACTCAACA	Quantifizieren von <i>S. oneidensis</i> durch qPCR
3540	qPCR_S.on_speC_for	GTGAAGAGCATCTTCGACC	Quantifizieren von <i>S. oneidensis</i> speC durch qPCR
3541	qPCR_S.on_speC_rev	TAGTTAGCAGGGAAGCCG	Quantifizieren von <i>S. oneidensis</i> speC durch qPCR
3542	qPCR_S.on_rpoA_for	GAAGCTATCCGTCGTTCTGC	Quantifizieren von <i>S. oneidensis</i> rpoA durch qPCR
3543	qPCR_S.on_rpoA_rev	GACAGGACGCAACAGAATCG	Quantifizieren von <i>S. oneidensis</i> rpoA durch qPCR
3544	500up_ldhA_for_OL_pMQ	CGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCGCG TCTGCGGCCGATTCTG	Konstruktion von pMQ150 500up <i>ldhA</i> P <sub>cctA</sub> glkgalP 500down <i>ldhA</i>
3545	500up_ldhA_rev_OL_P <sub>cctA</sub>	GTCTAATAAATTGGATTAATTATCTTTAGCG AATTTAGC	Konstruktion von pMQ150 500up <i>ldhA</i> P <sub>cctA</sub> glkgalP 500down <i>ldhA</i>
3546	glk_for_OL_P <sub>cctA</sub>	CATTGGAGGATACAATTATGACAAAGTATG CATTAGTCG	Konstruktion von pMQ150 500up <i>ldhA</i> P <sub>cctA</sub> glkgalP 500down <i>ldhA</i>
3547	galP_rev_OL_500_down_ldhA	GGTATTTATCTGTCAGTTAATCGTGAGCGCC TATTTTC	Konstruktion von pMQ150 500up <i>ldhA</i> P <sub>cctA</sub> glkgalP 500down <i>ldhA</i>
3548	500_down_ldhA_for	CTGACAGATAAATACCTGACTG	Konstruktion von pMQ150 500up <i>ldhA</i> P <sub>cctA</sub> glkgalP 500down <i>ldhA</i>
3549	500_down_ldhA_rev_OL_pMQ150	CAGTGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGCCAA TACAGACGCCCATGC	Konstruktion von pMQ150 500up <i>ldhA</i> P <sub>cctA</sub> glkgalP 500down <i>ldhA</i>
3550	Test_ldh::galP_glk_P <sub>cctA</sub> _for	CGACTGAGTGAGTCATTACC	Sequenzierung von <i>S. oneidensis</i> Δ <i>ldhA</i> ::P <sub>cctA</sub> glkgalP
3551	Test_ldh::galP_glk_P <sub>cctA</sub> _rev	TCACCCAACCTACTCTCCAG	Sequenzierung von <i>S. oneidensis</i> Δ <i>ldhA</i> ::P <sub>cctA</sub> glkgalPd
1191	pBAD_ohne_P <sub>Ara</sub> _rev	TTGGTAACGAATCAGACAATTGACGG	Konstruktion von pBAD_P <sub>cctA</sub> _alsSD
2775	pBAD_ohne_P <sub>Ara</sub> _for	AAACGGTCTCCAGCTTG	Konstruktion von pBAD_P <sub>cctA</sub> _alsSD

## Material und Methoden

3271	P <sub>cctA</sub> _for_OL_pBAD_ohne_P <sub>Ara</sub>	CAAGCCGTCAATTGTCTGATTCGTTACCAA ACTTTTCATACTCCCGCCATTC	Konstruktion von pBAD_P <sub>cctA</sub> _alsSD
3552	P <sub>cctA</sub> _for	TCCAATTTATTAGACAGTATGTAA	Konstruktion von pBAD_P <sub>cctA</sub> _alsSD
3553	P <sub>cctA</sub> _rev	AATTGTATCCTCCAATGGTGAT	Konstruktion von pBAD_P <sub>cctA</sub> _alsSD
3554	alsS_for_OL_P <sub>cctA</sub>	CATTGGAGGATACAATTATGTTGACAAAAG CAACAAAAGA	Konstruktion von pBAD_P <sub>cctA</sub> _alsSD
2088	alsD_OL_pBAD_rev	GGCTGAAAATCTTCTCTCATCCGCCAAAAC AGCCAAGCTGGAGACCGTTTTTATTCAGGG CTTCCTTCAG	Konstruktion von pBAD_P <sub>cctA</sub> _alsSD
2704	Test_pBAD_P <sub>cctA</sub> _alsSD_for	CTTTGAGTGAGCTGATACCG	Sequenzierung von pBAD_P <sub>cctA</sub> _alsSD
1572	16s_Bacteria_for	GAGTTTGATCCTGGCTCA	Sequenzierung des 16S rRNA Gens
1573	16s_Bacteria_rev	AGAAAGGAGGTGATCCAGCC	Sequenzierung des 16S rRNA Gens

### 4.3.1. Präparative Polymerase-Kettenreaktion

Zur Amplifikation präparativer DNA-Fragmente wurde die PCR BIO Hifi Polymerase (PCR Biosystems, London, Großbritannien) nach Herstellerangaben in Volumina zwischen 15 und 50 µl verwendet. Abweichend vom Standardprotokoll wurde jeder PCR Ansatz mit 4 % DMSO versetzt. Die Zusammensetzung des zur präparativen PCR verwendeten Reaktionsansatzes ist in Tabelle 9 aufgeführt. Das Amplifikations-Protokoll ist in Tabelle 10 zu finden. Die Elongationszeit und die Annealing-Temperatur wurden je nach Produkt und Oligonukleotiden angepasst.

**Tabelle 9: Zusammensetzung der 50 µl Ansätze für präparative PCRs.**

Komponente	Volumen [µl]
5 x Puffer	10
Primer [10 µM]	2
<i>forward</i> und <i>reverse</i>	
DMSO	2
Polymerase	0,5
Template	0,5
ddH <sub>2</sub> O	33

**Tabelle 10: Protokoll zur präparativen PCR.**

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Zeit [s]</b>	<b>Zyklen</b>
Initiale Denaturierung	95	300	1
Denaturierung	95	15	
Annealing	55-65	15	28-35
Elongation	72	15 s/kb	
Finale Elongation	72	300	1

#### 4.3.2. Analytische Polymerase-Kettenreaktion

Zur Amplifikation analytischer DNA-Fragmente wurde der Taq-Polymerase basierte *ready-to-use*-Mix (MangoMix, Bionline, Luckenwalde, Deutschland) verwendet. Hierbei wurden jeweils 15 µl Ansätze nach Herstellerangaben genutzt. Um Einzelklone mittels PCR-Reaktionen zu untersuchen, wurden Bakterienkolonien als Grundlage für die PCR-Reaktion eingesetzt. Damit entfiel die vorangehende DNA-Isolation (Güssow und Clackson, 1989). Die Zusammensetzung des zur analytischen PCR verwendeten Reaktionsansatzes ist in Tabelle 11 aufgeführt. Das Amplifikations-Protokoll kann Tabelle 12 entnommen werden. Die Elongationszeit und die Annealing-Temperatur wurden je nach Produkt und Oligonukleotiden angepasst.

**Tabelle 11: Zusammensetzung der 15 µl Ansätze für analytische PCRs.**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen [µl]</b>
MangoMix	7,5
Primer (10 µM)	0,75
forward und reverse	
Template	0,5
DNA oder Kolonie	
ddH <sub>2</sub> O	13

**Tabelle 12: Protokoll zur analytischen PCR.**

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Zeit [s]</b>	<b>Zyklen</b>
Initiale Denaturierung	95	600	1
Denaturierung	95	30	
Annealing	55-65	15	28-35
Elongation	72	30 s/kb	
Finale Elongation	72	300	1

### 4.3.3. Quantitative Polymerasekettenreaktion

Um quantitative Bestimmungen von DNA-Konzentrationen durchzuführen, wurden spezifische Primer für das Gen des flavodoxin Protein *mioC* verwendet, welche ein 121 bp langes Stück amplifizieren. Zur Amplifikation wurde der *SsoAdvanced<sup>TM</sup> Universal SYBR<sup>®</sup> Green Supermix* (Biorad, Feldkirchen, Deutschland) nach Herstellerangaben mit jeweils 1 µl DNA als Template verwendet.

Um die Menge an Transkripten bestimmter Gene zu quantifizieren, wurde zuvor synthetisierte cDNA verwendet (4.2 cDNA-Synthese). Diese wurde durch genspezifische Primer ebenso mithilfe des *SsoAdvanced<sup>TM</sup> Universal SYBR<sup>®</sup> Green Supermix* (Biorad, Feldkirchen, Deutschland) nach Herstellerangaben mit jeweils 2 µl DNA als Template amplifiziert.

Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur quantitativen Amplifikation von cDNA und DNA ist in Tabelle 13 aufgeführt. Das Protokoll zu Amplifikation kann Tabelle 14 entnommen werden.

**Tabelle 13: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur Amplifikation von cDNA und DNA.**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen [µl]</b>
SsoAdvanced™ Universal	10
SYBR® Green Supermix	
Primer [10 µM]	2
forward und reverse	
cDNA/DNA	2/1
ddH <sub>2</sub> O	16/17

**Tabelle 14: Protokoll zur quantitativen PCR.**

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Zeit [s]</b>	<b>Zyklen</b>
Initiale Denaturierung	95	420	1
Denaturierung	95	10	
Annealing	60	15	
Elongation	65	30 s, danach Messung der Fluoreszenz	30-35
Finale Elongation	65 - 98	5 s, danach Messung der Fluoreszenz und Anstieg der Temperatur um 0,5 °C	1

#### **4.4. Sequenzierung**

##### **4.4.1. Sanger-Sequenzierung**

Um Plasmide und genomische Veränderungen zu verifizieren, wurden entweder komplette Plasmide oder PCR Produkte mit dem *Mix2Seq NightXpress Kit* (Eurofins, Ebersberg, Deutschland) nach der Sanger Methode sequenziert.

##### **4.4.2. Genom-Resequenzierung**

Um das Genom von *S. oneidensis* nach einer Adaptation zu resequenzieren, wurde zunächst die chromosomale DNA isoliert (siehe II.4.1.2 Isolation chromosomaler DNA). Im Anschluss wurde eine Illumina-Sequenzierung durch IMG (IMG Laboratories, Planegg, Deutschland) durchgeführt. Hierfür wurde die isolierte genomische DNA fragmentiert und die DNA-

Bibliothek mit einem *NEBNext® Ultra™ II FS DNA library preparation* Kit (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland) erstellt. Die Sequenzierung wurde auf einer MiSeq Plattform mit einer Sequenzierlänge von 2 x 150 bp (PE150) durchgeführt. Die Anzahl der generierten *reads* kann Tabelle 15 entnommen werden.

**Tabelle 15: Anzahl der generierten *reads* pro Genom-Probe.**

<b>Probe (Stammnummer)</b>	<b>Anzahl</b>
Ausgangsstamm (1792)	8.580.396
4B (1730)	9.103.498
10A (1732)	7.320.064

#### 4.4.3. Transkriptom-Sequenzierung

Die in Kapitel II.4.1.4 beschriebenen RNA-Proben wurden ebenfalls durch IMGGM (IMGGM Laboratories, Planegg, Deutschland) auf einem Illumina NextSeq 500 sequenziert. Zuvor wurden die RNA-Proben mit dem *TruSeq Stranded Total RNA HT Kit* (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland) nach Herstellerangaben auf die Sequenzierung vorbereitet. Im Anschluss wurden *single-end* 75 bp *reads* sequenziert. Die Anzahl der generierten *reads* kann Tabelle 16 entnommen werden.

**Tabelle 16: Anzahl der generierten *reads* pro Transkriptom-Probe.**

<b>Probe</b>	<b>Anzahl Reads</b>
<i>S. oneidensis</i> WT - 1	15.079.126
<i>S. oneidensis</i> WT - 1	14.855.677
<i>S. oneidensis</i> WT + 37 nM Riboflavin - 1	18.030.674
<i>S. oneidensis</i> WT + 37 nM Riboflavin - 2	15.420.771

#### 4.5. Restriktion und Ligation

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von New England Biolabs (Schwalbach) bezogen und nach Herstellerangaben verwendet. Die Zusammensetzung der Restriktionsansätze kann Tabelle 17 entnommen werden. Bei unvollständigem Restriktionsverdau, wurde der Verdau über Nacht fortgesetzt.

**Tabelle 17: Zusammensetzung der Restriktionsansätze.**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen / Konzentration</b>
Plasmid	2 µg
Enzym	1 µl (jeweils)
CutSmart Puffer	5 µl
ddH <sub>2</sub> O	Auf 50 µl auffüllen

Im Anschluss an den Verdau wurde der gesamte Restriktionsansatz über ein Agarosegel aufgetrennt (siehe II.4.6 Agarose-Gelelektrophorese) und aufgereinigt.

Zur Ligation wurde das Verfahren der isothermalen *in-vitro*-Ligation nach Gibson verwendet (Gibson *et al.*, 2009). Hierzu wurden äquimolare Mengen der zu ligierenden Fragmente in einer gesamt-DNA-Konzentration von 10-100 ng und einem Volumen von 5 µl in einen Reaktionsansatz mit 15 µl gegeben. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist in Tabelle 18 zu finden. Die Zusammensetzung der für den Reaktionsansatz benötigten 5 x Stammlösung ist in Tabelle 19 aufgeführt.

**Tabelle 18: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur *in-vitro*-Ligation nach Gibson.**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen [µl]</b>
5 x Stammlösung	80
PCRBIO HiFi Polymerase (2 U/µl)	5
Taq DNA-Ligase (40 U/µl)	40
T5 Exonuklease (0,1 U/µl)	16
ddH <sub>2</sub> O	239

**Tabelle 19: Zusammensetzung der 5 x Stammlösung für Ligationsansätze.**

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
Tris/HCl pH 7,5 (1 M)	125 µl
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O (1 M)	12,5 µl
dNTPs (10 mM)	25 µl
DTT (1 M)	12,5 µl
NAD <sup>+</sup> (100 mM)	12,5 µl
Polyethylenglycol-8000	62,5 mg
ddH <sub>2</sub> O	62,5 µl

#### 4.6. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Hierzu wurde 1 % Agarose bis zum vollständigen Lösen in TAE-Puffer (Tabelle 20) aufgekocht. Anschließend wurde der Puffer nach kurzem Abkühlen mit 2 ppm *Midori Green DNA Stain* (NIPPON Genetics, Düren, Deutschland) versetzt. *Midori Green* interkaliert in doppelsträngige DNA und fluoresziert nach Anregung durch UV- oder Blau/Grün-Licht. Das Agarosegel wurde nach dem Auspolymerisieren in einer Laufkammer mit TAE-Puffer überschichtet. Um im Anschluss an die Elektrophorese die Größe der DNA-Fragmente zuordnen zu können, wurde in eine Tasche des Agarosegels *GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gegeben. Präparative Proben wurden mit 6 x Ladepuffer (Tabelle 21) versetzt. Analytische Proben, welche mithilfe des MangoMix amplifiziert wurden, enthielten bereits Ladepuffer. Die Proben wurden in die Taschen des Agarose Gels geladen und durch Anlegen einer Spannung von 120 V (Powerpac HC, Biorad, Feldkirchen, Deutschland) aufgetrennt.

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

<b>Komponente</b>	<b>Konzentration [mM]</b>
Tris-HCl pH 8	40
Essigsäure	20
Na <sub>2</sub> EDTA	1

**Tabelle 21: Zusammensetzung des 6 x Ladepuffers für die Agarose-Gelelektrophorese.**

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
Xylene cyanol	0,05 g
Bromphenolblau	10 mg
Glycerin	12 ml
50x TAE	1,5 ml
ddH <sub>2</sub> O	15 ml

Die Detektion der Nukleinsäurebanden erfolgte bei präparativen Gelen mithilfe des *FastGene® Blue/Green LED Transilluminator* (Nippon Genetics, Düren, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 500 nm. Die Banden wurden gegebenenfalls aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die DNA mit dem *Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega, Mannheim, Deutschland) aufgereinigt. Nukleinsäurebanden analytischer Gele wurden mithilfe des ChemiDoc™ XRS<sup>+</sup> Systems (Biorad, Feldkirchen, Deutschland) detektiert.

#### **4.7. Quantifizierung von Nukleinsäuren**

Die Quantifizierung von Nukleinsäuren erfolgte mithilfe des NanoDrop ND-2000 Spektrophotometers (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Hierzu wurde zunächst ddH<sub>2</sub>O als Referenz gemessen. Im Anschluss wurden jeweils 1,5 µl der zu messenden Probe aufgetragen. Die Messung der Absorption erfolgte bei 230, 260 und 280 nm. Sowohl DNA als auch RNA weisen ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm auf. Im Gegensatz dazu haben Proteine ihr Absorptionsmaximum 280 nm und Phenole bei 230 nm. Die Messungen bei unterschiedlichen Wellenlängen dienen daher zur Bestimmung der Reinheit. Ist der Quotient von 260/280 größer als 1,8, ist von reiner DNA auszugehen. Übliche Werte liegen zwischen 2,0 und 2,2. Bei niedrigeren Werten ist eine Verunreinigung durch Proteine wahrscheinlich.

#### **4.8. Herstellung kompetenter Zellen und Transformation**

Um Plasmid-DNA in bakterielle Zellen einzubringen, wurde in dieser Arbeit die Elektrottransformation verwendet. Die Herstellung elektrokompeter Zellen erfolgte dabei immer zum sofortigen Gebrauch. Dazu wurde zunächst eine Vorkultur des gewünschten Stammes in LB-Medium kultiviert. Während der exponentiellen Wachstumsphase, zwischen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 und 0,8, wurden die Zellen in einer Tischzentrifuge für 30 s bei 16.372 g pelletiert und viermal mit sterilem ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen in

200 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Zur Transformation wurden zu jeweils 50 µl Zellsuspension 2 µg Plasmid oder 10 µl eines isothermalen *in-vitro*-Ligationsansatzes gegeben. Die Elektroporation erfolgte in Elektroporationsküvetten (1 mm Elektrodenabstand, Biorad, Feldkirchen, Deutschland) mithilfe eines Mikropulsers (Biorad, Feldkirchen, Deutschland) durch Anlegen einer Spannung. Die angelegte Spannung betrug bei Transformationen mit *E. coli* 1,8 kV für 3-5 ms, bei *S. oneidensis* wurde eine Spannung von 1,2 kV für 2-4 ms angelegt. Sofort nach der Elektroporation wurden die Zellen in 800 µl LB-Medium aufgenommen und für eine Stunde (*E. coli*) oder zwei Stunden (*S. oneidensis*) bei 37 °C bzw. 30 °C inkubiert.

Isothermale *in-vitro*-Ligationsansätze wurden vor der Elektroporation auf eine Dialysemembran (Typ VSWP, Millipore, Eschborn, Deutschland) auf Wasser gegeben und 30 min inkubiert, um überschüssige Ionen zu entfernen.

### **4.9. Konjugation und markerlose Modifikation von Genen in *S. oneidensis***

Um genomische Veränderungen in *S. oneidensis* einzuführen, wurde der Suizid-Vektor pMQ150 verwendet. Das Plasmid wurde mithilfe der Restriktionsendonukleasen BamHI und Sall linearisiert. In die Schnittstelle wurden 500 bp lange Bereiche eingefügt, welche die zu modifizierenden Bereiche flankieren. Zwischen die 500 bp langen Bereiche wurde gegebenenfalls die modifizierte Nukleinsäuresequenz eingefügt. Im Falle einer Deletion wurden die flankierenden Bereiche direkt aneinander ligiert. Die Fragmente wurden mithilfe der isothermalen *in-vitro*-Ligation nach Gibson (4.5 Restriktion und Ligation) in das Plasmid eingefügt und in *E. coli* WM3064 transformiert (4.8 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation). Dieser Stamm ist 2,6-Diaminopimelinsäure (DAP) auxotroph und damit zum Wachstum auf die Zugabe von DAP angewiesen. Das pMQ150-Plasmid trägt den R6K Replikationsursprung (*origin of replication, ori*), welcher nur in Zellen mit einem  $\pi$ -Protein repliziert werden kann. *E. coli* WM3064 trägt das *pir*-Gen, welches für das  $\pi$ -Protein kodiert und kann das Plasmid dadurch stabil replizieren. Des Weiteren enthält das Plasmid *sacB*, ein Gen, das für eine Levansaccharase kodiert. Diese katalysiert die Umwandlung von Sukrose zu Zuckerpolymeren.

Zur Konjugation des Plasmids in *S. oneidensis* wurde der Zielstamm zusammen mit einem *E. coli* WM3064, welcher das zuvor erstellte Plasmid enthielt, auf eine Agarplatte ohne Antibiotikum mit 0,3 mM DAP ausgestrichen. Nach Inkubation über Nacht bei 30 °C wurde eine größere Zellmenge auf eine neue Agarplatte mit Kanamycin, ohne DAP überführt. Durch den Mangel an DAP ist *E. coli* WM3064 nicht in der Lage zu wachsen, während durch die Antibiotikazugabe nur *S. oneidensis*-Klone Wachstum zeigen, die das Plasmid aufgenommen

haben. Da *S. oneidensis* das Plasmid in Ermangelung eines  $\pi$ -Proteins nicht stabil replizieren kann, wachsen nur Klone, welche das Plasmid in das Genom eingebracht haben. Nach Inkubation über Nacht wurden einzelne *S. oneidensis*-Klone erneut auf eine Agarplatte mit Kanamycin überführt, um eine Verschleppung von *E. coli* Klonen auszuschließen. Danach wurden Einzelklone in flüssiges LB-Medium ohne Selektionsmarker überführt. Am Folgetag wurde die Bakterienkultur 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10.000 verdünnt und 50  $\mu$ l der Verdünnung auf LB-Agarplatten ohne Salz mit 10 % Sukrose ausplattiert. Bakterien, die noch Reste des pMQ150 Plasmids im Genom haben, bilden unter Zugabe von Sukrose durch die Levansaccharase Zuckerpolymere. Diese Zuckerpolymere schneiden die Bakterien von der Nährstoffzufuhr ab und führen dadurch zum Zelltod. Es können also nur Bakterien überleben, welche das Plasmid aus dem Genom entfernt haben. Bei diesen Bakterien besteht eine 50 % Chance, dass der Genotyp dem WT oder der gewünschten Mutante entspricht. Die auf Sukrose wachsenden Kolonien wurden auf Kanamycin-Sensitivität überprüft und Kanamycin-sensitive Klone mithilfe einer PCR und anschließender Sequenzierung auf den gewünschten Genotyp hin überprüft.

### **4.10. Bioinformatische Auswertung von Sequenzierdaten**

#### **4.10.1. Auswertung von Sanger-Sequenzierungen**

Sanger-Sequenzierungen wurden mithilfe der CLC Main Workbench (Qiagen, Aarhus, Dänemark) *in silico* überprüft. Dabei wurden folgende Parameter gewählt: Alignmentmodus: *Assemble sequence to reference*, *Minimum aligned read length* = 50, *Alignment stringency* = *Medium*, *Trimming* = *manual*.

#### **4.10.2. Auswertung der Genom-Resequenzierungen**

Die Analyse der Genom-Resequenzierungen erfolgte mithilfe der CLC Genomics Workbench Version 12.0.4 (Qiagen, Aarhus, Dänemark). Hierzu wurden zunächst die Adaptersequenzen der Rohdaten getrimmt (siehe II.4.4.2. Genom-Resequenzierung) und *reads* mit einer geringen Qualität entfernt ( $p < 0,05$ ). Im Anschluss wurden die *reads* mit dem Genom des Ausgangsstamms der Adaptation und dem pBAD<sub>P<sub>stc</sub></sub>*alsSD*-Plasmid (Stamm 1792) mittels der *fixed ploidy variant detection* abgeglichen und eine Variantendetektion durchgeführt. Sofern nicht anders angegeben wurde die Auswertung nach Standardeinstellungen durchgeführt. Dabei wurde eine Mutations-Wahrscheinlichkeit von mindestens 90 % gewählt und es wurden lediglich Genomstellen berücksichtigt, welche mindestens 10-fach abgedeckt waren. Des Weiteren wurde die Mindestmutationsrate auf  $\geq 50$  % festgelegt, was bedeutet, dass mindestens 50 % der abdeckenden *reads* die Mutation enthalten.

### 4.10.3. Auswertung der Transkriptom-Sequenzierungen

Die Transkriptom-Analysen wurden mit der CLC Genomics Workbench Version 12.0.3 (Qiagen, Aarhus, Dänemark) durchgeführt. Zunächst wurden die erhaltenen Rohdaten der Illumina-Sequenzierung (siehe II.4.4.3. Transkriptom-Sequenzierung) prozessiert. Dafür wurden die für die Sequenzierung benötigten Adaptersequenzen getrimmt und *reads* mit einer zu geringen Qualität entfernt ( $p < 0,05$ ). Die *75-nt-single-end*-Sequenzierungen lieferten im Durchschnitt 15 Millionen *reads* nach Prozessierung, die auf das *S. oneidensis* Referenzgenom *gemapped* wurden. Die Abdeckung des Genoms war 233-fach. Zum Vergleich wurden *transcript per million* (TPM)-Werte herangezogen, die einen *false discovery rate* (FDR) p-Wert von unter 0,05 hatten.

## 5. Proteinbiochemische Methoden

### 5.1. Zellaufschluss

Vor dem Zellaufschluss wurden die Zellen für die anschließende Proteomanalyse in anoxischem M4-Medium mit 70 mM Lactat als Elektronendonator und 100 mM Fumarat als Elektronenakzeptor kultiviert. Die Ausgangs-OD<sub>600</sub> betrug 0,2. Nach 5 h Wachstum wurden die Zellen durch Zentrifugation (7 min, 6000 g, 4°C) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets wurden in TRIS-Puffer (pH 6,8) resuspendiert. Im Anschluss wurden die Zellen mittels French Press (American Instruments Company, Maryland, USA) in einem Volumen von 10-20 ml durch Anlegen eines Arbeitsdrucks von 1250 psi lysiert. Bei konstantem Arbeitsdruck wurde die Bakteriensuspension durch eine Kanüle (Ø 0,8 mm) auf Normaldruck entlassen. Dieses Vorgehen wurde zweimal pro Probe wiederholt, um einen maximalen Zellaufschluss zu gewährleisten. Nach dem Zellaufschluss wurde die Probe bei 4 °C auf Eis gelagert. Um nicht aufgeschlossene Zellen zu entfernen, wurde die Suspension für 15 min bei 9000 g zentrifugiert.

### 5.2. Proteinquantifizierung

Um den Proteingehalt aufgeschlossener Zellsuspensionen zu quantifizieren, wurde die Methode nach Bradford angewandt (Bradford, 1976). Dabei bindet Coomassie Brilliant Blau G250 unspezifisch an unpolare und kationische Seitenketten von Proteinen. Durch die Bindung verschiebt sich das Absorptionsspektrum des Farbstoffs von 470 nm nach 595 nm. Um die Proteinkonzentrationen der Proben zu bestimmen, wurde eine Albumin Fraktion V Lösung in einem Konzentrationsbereich zwischen 0 und 0,1 mg/ml hergestellt. Proben und Standards wurden in einer 96-Well Platte 1:10 mit Bradford-Reagenz (Tabelle 22) versetzt und die Absorption bei 595 nm gemessen.

**Tabelle 22: Zusammensetzung des Bradfordreagenz.** Die einzelnen Bestandteile wurden in der angegebenen Reihenfolge gemischt und über einen Papierfilter filtriert.

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
Coomassie Brilliant Blau G 250	100 mg
Phosphorsäure (85 %)	100 ml
Ethanol (96 %)	50 ml
ddH <sub>2</sub> O	auf 1 l auffüllen

### 5.3. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch eine diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis* (SDS-PAGE)) nach Laemmli (Laemmli, 1970). Die Proben wurden jeweils auf einen Gesamt-Proteingehalt von 30 µg in 25 µl eingestellt und mit 5 µl 6 x Laemmli-Ladepuffer (Tabelle 23) versetzt. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben für 5 min bei 95 °C inkubiert.

**Tabelle 23: Zusammensetzung des 6 x Laemmli-Ladepuffers.**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen [ml]</b>
1 M Tris/HCl (pH 6,8)	1,5 ml
10 % SDS	6
Glycerin	5
β-Mercaptoethanol	3
0,5 % Bromphenolblau	3

Das SDS-Gel (4 - 15 % Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels, Biorad, Feldkirchen, Deutschland) wurde in die Laufkammer eingesetzt und mit SDS-Laufpuffer (Tabelle 24) überschichtet. Anschließend wurde das Gel mit den Proteinproben und 3 µl des Blue Prestained Protein Markers (Nippon Genetics, Düren, Deutschland) beladen. Im Anschluss wurden die Proteine bei einer konstanten Spannung von 120 V aufgetrennt.

**Tabelle 24: Komponenten des SDS-Laufpuffers.** Der pH - Wert wurde mithilfe von HCl auf 5,8 justiert.

<b>Komponente</b>	<b>Menge [g/l]</b>
SDS	1
Glycin	14,4
Tris	3

#### 5.4. Proteinfärbung

Nach der Auftrennung der Proteinproben im SDS-Gel wurden die Proteine mit einer Coomassie-Färbung angefärbt. Hierbei lagert sich der Coomassie-Brilliant-Blau<sup>®</sup> Farbstoff an unpolare und kationische Seitenketten der Aminosäuren an (Zehr *et al.*, 1989). In dieser Arbeit wurde zur Färbung die InstantBlue-Lösung (Expedeon, vwr, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Lösung wurde nach Herstellerangaben verwendet und das gefärbte SDS-Gel im Anschluss mithilfe des Gel Doc XR Systems (Biorad, Feldkirchen Deutschland) fotografiert.

#### 5.5. Proteomanalyse

Die Proteom-Analysen wurden von der Kooperationspartnerin Julia Novion Ducassou (Exploring the Dynamics of Proteomes, Grenoble/Frankreich) durchgeführt. Dazu wurden die Zelllysate mit Laemmli-Puffer (Laemmli, 1970) versetzt und über eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)-Gels (4 – 15 % NuPAGE-Gel, Invitrogen, Illkirch-Graffenstaden, Frankreich) der Größe nach aufgetrennt. Nach Färbung mit R-250 Coomassie Blau (Biorad, Schiltigheim, Frankreich) wurden die Proteine im Gel mit modifiziertem Trypsin (Sequencing Grade, Promega, Charbonnières les Bains, Frankreich) geschnitten (Salvetti *et al.*, 2016).

Die resultierenden Peptide wurden mittels nanoLC-MS/MS analysiert (Ultimate 3000 RSLCnano und Q-Exactive HF, Thermo Scientific, Illkirch-Graffenstaden, Frankreich). Dazu wurden die Peptide auf einer 300 µm × 5 mm PepMap C18-Vorsäule (Thermo Scientific, Illkirch-Graffenstaden, Frankreich) gesammelt und auf einer 75 µm x 250 mm C18-Säule (Reprosil-Pur 120 C18-AQ, 1,9 µm, Dr. Maisch, Ammerbuch-Entringen) mit einem 180-min-Gradienten getrennt. Die MS- und MS/MS-Daten wurden mit Xcalibur (Version 4.1.31.9, Thermo Scientific, Illkirch-Graffenstaden, Frankreich) erfasst. Peptide und Proteine wurden mit Mascot (Version 2.6.0, Matrix Science, London, Großbritannien) durch gleichzeitige Suche gegen die Uniprot-Datenbank (*S. oneidensis* MR-1 Taxonomie, Version vom Januar 2019), eine eigene Kontaminanten-Datenbank und die dazugehörigen reversen Datenbanken identifiziert.

Als Enzym wurde Trypsin/P gewählt, und es wurden zwei Fehlsplaltungen zugelassen. Die Fehlertoleranzen für Vorläufer- und Fragmentmasse wurden auf 10 bzw. 25 mmu festgelegt. Die bei der Suche erlaubten Peptidmodifikationen waren Carbamidomethyl (C, fest), Acetyl (Protein N-term, variabel) und Oxidation (M, variabel). Die Proline-Software (Bouyssié *et al.*, 2020) wurde zum Aufstellen, Filtern und Gruppieren der Ergebnisse verwendet (Konservierung der Peptide auf Rang 1, Peptid-Wert  $\geq 25$ , Peptidlänge  $\geq 7$  Aminosäuren, Peptididentifikation FDR  $< 1\%$  des unter Verwendung der reversen Datenbankstrategie berechneten Peptid-Werts, Minimum der spezifischen Peptide pro identifizierter Proteingruppe = 1).

Die statistische Auswertung wurde mit der ProStar-Software (Version 1.14) durchgeführt (Wieczorek *et al.*, 2016). Proteine, die in den reversen und Kontaminanten-Datenbanken identifiziert wurden sowie Proteine, die in weniger als drei Replikaten einer Bedingung quantifiziert wurden, wurden aus der Liste verworfen.

Nach der  $\log_2$ -Transformation wurden die Abundanzwerte mit der vsn-Methode normalisiert, bevor fehlende Werte imputiert wurden (slsa-Algorithmus für teilweise beobachtete Werte in der Bedingung und DetQuantile-Algorithmus für vollständig fehlende Werte in der Bedingung). Die statistischen Tests wurden mit *limma* durchgeführt. Differentiell exprimierte Proteine wurden unter Verwendung eines  $\log_2$ -fold-change, Cut-Offs von 1 und eines p-Wert Cut-Offs von 0,05 aussortiert, sodass eine FDR von weniger als 5 % nach dem adjustierten Benjamini-Hochberg (abh) Schätzer erreicht werden konnte.

## 6. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

### 6.1. Quantifizierung von Zuckern und organischen Säuren

Die Quantifizierung von Glukose und organischen Säuren erfolgte mithilfe einer HPLC. Dabei wurde als stationäre Phase eine Aminex HPX-87H Säule (300 x 7,8 mm) (BioRad, Feldkirchen, Deutschland) verwendet und als mobile Phase 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Je nach Interaktion eines Stoffes mit der stationären und der mobilen Phase ergeben sich spezifische Retentionszeiten. Die Retentionszeiten lassen sich durch die Verwendung externer Standards zu organischen Säuren oder Zuckern zuordnen. Vor dem Laden der Proben auf die Säule wurden diese mit einem 0,2 µm PTFE Spritzenvorsatzfilter filtriert und 150 µl Probe wurden mit je 15 µl 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> versetzt. Pro Probe wurden 50 µl Probenvolumen auf die Säule appliziert. Die Trennung der Proben erfolgte mithilfe eines UltiMate3000 SD HPLC Systems (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bestehend aus einer Niederdruckgradientenpumpe mit integriertem Entgaser, einem analytischen Autosampler, einem Säulentermostat, einem analytischen Dioden-Array-

Detektor (DAD) und einem RefraktoMax 521 Brechungsindex Detektor (RI). Zucker und organische Säuren wurde mithilfe des RI bei einer Polarisation von 500 mV detektiert, während Acetoin mithilfe des DAD bei  $\lambda = 275$  nm detektiert wurde.

### **6.2. Quantifizierung von Flavinen**

Zur Quantifizierung verschiedener Flavinspezies wurde eine HPLC genutzt. Dabei wurde als stationäre Phase eine Luna<sup>®</sup> Säule (5  $\mu$ m C18(2) 100 Å, 250 x 4.6 mm) (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) verwendet und als mobile Phase ein nicht linearer Gradient aus Methanol und 20 mM Ammoniumacetat (pH 5,4). Der Gradient der mobilen Phase wurde nach von Canstein und Kolleg:innen gewählt (von Canstein *et al.*, 2008). Je nach Interaktion der Flavine mit der stationären und der mobilen Phase ergeben sich spezifische Retentionszeiten. Die Retentionszeiten lassen sich durch die Verwendung externer Standards den einzelnen Flavinspezies zuordnen. Vor dem Applizieren der Proben auf die Säule, wurden diese mit einem 0,2  $\mu$ m PTFE-Spritzenvorsatzfilter filtriert. Pro Probe wurden 20  $\mu$ l Probenvolumen auf die Säule appliziert. Die Trennung der Proben erfolgte mithilfe eines UltiMate3000 SD HPLC Systems (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bestehend aus einer Niederdruckgradientenpumpe mit integriertem Entgaser, einem analytischen Autosampler, einem Säulentermostat und einem Fluoreszenz-Detektor (FLD-3400RS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Die Flavine wurden dabei bei einer Anregung von 440 nm und einer Emission bei 525 nm detektiert.

## **7. Anzucht und Analyse von Biofilm in mikrofluidischen Kultivierungs-Plattformen**

### **7.1. Herstellung mikrofluidischer Kultivierungs-Plattformen**

Die Kultivierung von Biofilm erfolgte in mikrofluidischen Chipsystemen nach Hansen und Kolleg:innen (Hansen *et al.*, 2019). Die Grundgröße der Kultivierungs-Plattformen betrug 76 x 26 mm und enthielt einen geraden Kultivierungskanal. Zur Herstellung der Kultivierungs-Plattformen wurde das Sylgard<sup>®</sup> 184 Silicone Elastomer Kit (Dow Corning, Michigan, USA) nach Herstellerangaben verwendet. Das Silikon wurde in eine Negativ-Form aus Messing gefüllt und bei 60 °C für 2 h ausgehärtet. Die so entstandene Kultivierungs-Plattform hatte ein Gesamtvolumen von 354  $\mu$ l (Hansen *et al.*, 2019) und konnte durch Einsetzen von Kanülen mit einer Schlauchinfrastruktur konnektiert werden. Durch die Verwendung von Silikon als Umgebungsmaterial war zudem eine Diffusion von Sauerstoff als Elektronenakzeptor gegeben.

### **7.2. Wachstum des Biofilms in mikrofluidischen Kultivierungs-Plattformen**

Die *S. oneidensis*-Vorkultur wurde unter oxischen Bedingungen in M4-Medium mit 70 mM Laktat kultiviert und durch Zentrifugation pelletiert (7 min, 6000 g). Die Zellen wurden dreimal mit M4-Medium ohne Elektronen-Donor oder -Akzeptor gewaschen und im Anschluss auf eine OD<sub>600</sub> von 0,24 eingestellt. Zur Inokulation wurde ein Medienfluss von 2 ml/h und ein Fluss der Inokulationskultur von 1 ml/h gewählt. Die Kultivierungs-Plattformen wurden für 2 h inokuliert. Danach wurde der Fluss der Inokulationskultur gestoppt und der Medienfluss auf 1 ml/h reduziert. Nach 6 Tagen des Biofilm-Wachstums wurde der Überstand des Biofilms vorsichtig abgenommen und der Biofilm durch Pipettieren resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden mithilfe einer Neubauer Kammer gezählt und die Riboflavin-Konzentration des Überstands und des Biofilms wurde mittels HPLC quantifiziert (siehe II.6.2 Quantifizierung von Flavinen).

### **7.3. Optische Kohärenztomografie**

Das Wachstum des Biofilms wurde mithilfe von optischer Kohärenztomografie (*optical coherence tomography*, OCT) quantifiziert. OCT ist ein nicht invasives bildgebendes Verfahren, das es ermöglicht dreidimensionale Scans von Strukturen zu erzeugen. Hierzu wird die Oberfläche der Strukturen mithilfe von Licht gescannt (Wagner and Horn, 2017). Bei einem OCT-Scan wird das Licht einer Lichtquelle von der zu analysierenden Probe reflektiert und gestreut und interferiert im Anschluss mit dem Licht eines Referenzarms. Diese Interferenz wird von einem Detektor aufgezeichnet und analysiert, um eine dreidimensionale Darstellung der Probe zu erhalten. Da das Licht in der Lage ist, in die Probe einzudringen, kann ein Tiefenprofil der Probe erstellt werden. Durch die Aufnahme eines solchen Tiefenprofils anhand einer festgelegten Achse, wird eine 2D-Ansicht des Biofilms erstellt. Mehrere solcher zweidimensionalen Aufnahmen hintereinander ergeben schließlich eine 3D-Aufnahme des Biofilms (Wagner and Horn, 2017). Die OCT-Aufnahmen dieser Arbeit wurden mit einem Ganymede II - LSM04 OCT-Gerät von Thorlabs (Dachau, Deutschland) durchgeführt. Das Biofilmvolumen wurde dabei am Anfang, in der Mitte und am Ende der Kultivierungs-Plattform gemessen.

### **7.4. Ermittlung des Biofilmvolumens**

Zur Auswertung der OCT-Aufnahmen und der Ermittlung des Biofilmvolumens wurde ImageJ (Schneider *et al.*, 2012) mit von Bauer und Kolleg:innen erstellten Makros verwendet (Bauer *et al.*, 2019).

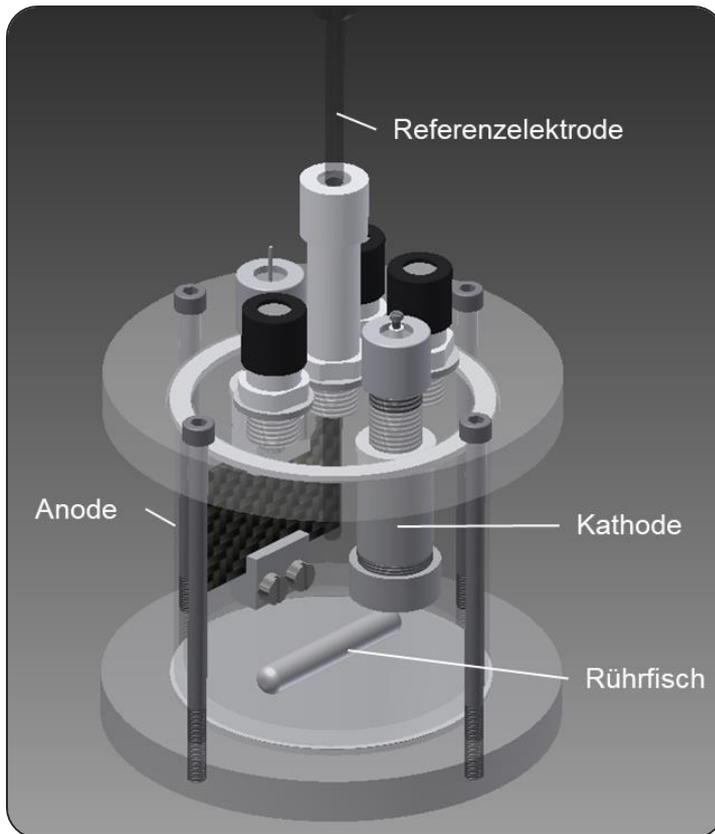
Das Biofilmvolumen wurde wie von Hackbarth und Kolleg:innen beschrieben ermittelt (Hackbarth *et al.*, 2020).

### 8. Bioelektrochemische Systeme

#### 8.1. Aufbau und Inbetriebnahme der BES

In dieser Arbeit wurden BES dazu verwendet, Mikroorganismen auf ihre Stromproduktion und ihre Biofilmbildung hin zu untersuchen. Dazu wurde, soweit nicht anders angegeben, ein konstantes Potential von 0 mV gegen eine Normalwasserstoff-Elektrode (NHE) angelegt. Die in dieser Arbeit verwendeten BES wurden wie in Abbildung 7 gezeigt aufgebaut und mit 270 ml ddH<sub>2</sub>O gefüllt und autoklaviert. Als Kathodenmaterial wurde ein Platinnetz (99,9 %, 10,24 Maschen mm<sup>-2</sup>) verwendet, welches mithilfe eines Platindrahts mit dem Anschluss der Gegenelektrode verbunden wurde. Als Referenzelektrode wurde eine Standard-Ag/AgCl-Elektrode verwendet (Sensortechnik Meinsberg, Ziegra-Knobelsdorf, Deutschland). Als Anode diente das Kohlenstoffvlies GFD2,5 (Sigratherm; SGL Group, Wiesbaden, Deutschland) mit einer Grundfläche von 3,5 x 6 cm. Dieses wurde mithilfe einer Plastikhalterung im System fixiert und durch eine Kanüle mit dem Anschluss der Arbeitselektrode verbunden. Durch die Plastikhalterung stand eine frei zugängliche Anodenfläche von 36 cm<sup>2</sup> zum Elektronenübertrag der Bakterien zur Verfügung. Um eine konstante Durchmischung des Mediums zu gewährleisten, wurde ein Magnetrührfisch in die BES gegeben und durch einen Magnetrührer mit 300 rpm bewegt. Die BES wurden im Triplikat angesetzt und bei 30 °C inkubiert. Um anoxische Bedingungen zu gewährleisten, wurde das Kopfvolumen der BES konstant mit Stickstoff begast.

Vor der Inokulation der BES wurden die Mikroorganismen zunächst oxisch in LB-Medium angezogen und im Anschluss anoxisch in M4-Medium mit 70 mM Laktat und 100 mM Fumarat über Nacht bei 30 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert (7 min, 6000 g) und dreimal mit M4-Medium ohne Elektronendonator und -akzeptor gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen mit einer finalen OD<sub>600</sub> von 0,07 in das Anodenmedium gegeben. Das Anodenmedium bestand aus M4-Medium mit 70 mM Laktat ohne Elektronenakzeptor. Bei Bedarf wurden 50 µg/ml Kanamycin und 0,1 mM Arabinose zugegeben. Das Wasser wurde aus den autoklavierten BES entfernt und 270 ml des inokulierten Mediums wurden eingefüllt. Im Anschluss wurden die BES mit Stickstoff begast, um anoxische Bedingungen sicherzustellen. Zuletzt wurden die Anschlüsse der Arbeits-, Referenz- und Gegenelektroden angeschlossen.



**Abbildung 7: Aufbau eines BES.** Über die freien, schwarzen Anschlüsse wurde das BES kontinuierlich mit  $N_2$  begast und regelmäßig Proben entnommen.

## 8.2. Adaptation

Der Aufbau der BES zur Adaptation war identisch zu dem in II.8.1 (siehe II. 8.1 Aufbau und Inbetriebnahme der BES) beschriebenen Aufbau. Die Zellen zur Adaptation in BES wurden über Nacht in LB-Medium angezogen und durch Zentrifugation pelletiert. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit M4-Medium ohne Elektronendonator und Elektronenakzeptor gewaschen und in einer finalen  $OD_{600}$  von 1,1 in das Anodenmedium gegeben. Das Anodenmedium zur Adaptation war M4-Medium mit erhöhter HEPES-Konzentration (50 mM) und 50 mM Glukose als Elektronendonator. Das Medium wurde durch die Zugabe von 50  $\mu\text{g/ml}$  Kanamycin komplementiert.

Das Wasser wurde aus den autoklavierten BES entfernt und 270 ml des inokulierten Mediums zugegeben. Die initiale Adaptation fand im Unikat statt, während spätere Experimente zum Vergleich der Produktivität verschiedener Stämme im Triplikat durchgeführt wurden. Um eine optimale Leistung der BES sicherzustellen, wurde der pH-Wert ab einem Wert von 6 mithilfe von 3 M NaOH justiert. Um gleichmäßigere Bedingungen zu ermöglichen, wurde in der initialen Adaptation von Tag 38 bis Tag 62 eine automatische pH-Regulierung (Hach Lange, Düsseldorf, Deutschland; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) installiert, welche mithilfe

einer IP-N 4 ISMATEC Peristaltikpumpe (Cole-Parmer, Wertheim, Deutschland) den pH-Wert durch Zugabe 1 M NaOH zwischen 6 und 7,4 hielt. Im Folgenden wurde diese jedoch aus Handhabungsgründen und aufgrund der Kontaminationsgefahr nicht weiterverwendet.

Um eine optimale Versorgung mit Nährstoffen zu gewährleisten, wurde das Medium der initialen Adaptation nach 62 Tagen aus dem System entfernt und durch neues Medium ersetzt. Durch dieses Vorgehen wurde gleichzeitig ein Selektionsvorteil für Biofilm-bildende *S. oneidensis*-Klone erzeugt. Nach 83 Tagen wurde die initiale Adaptation gestoppt. Zur Vereinfachung der weiteren Analyse wurde im Folgenden mit Einzelklonen weitergearbeitet. Diese entstammen der initialen Adaptation nach 83 Tagen und wurden über Verdünnungsreihen auf LB-Agarplatten vereinzelt.

Aus den 87 Einzelklonen wurden die 6 vielversprechendsten ausgewählt (siehe II.9. Quantifizierung von Wachstum auf Eisencitrat) und im Vergleich zu dem Ursprungstamm im Triplikat auf Stromproduktion, Biofilmbildung und Endproduktspektrum untersucht. Das Genom zweier dieser Klone wurde im Anschluss an die BES-Experimente resequenziert und ausgewertet.

### **9. Quantifizierung von Wachstum auf Eisencitrat**

Um aus den 87 Klonen der initialen Adaptation auf Glukose die vielversprechendsten Einzelklone zu identifizieren, wurde das Wachstum auf Eisencitrat und Glukose untersucht. Hierzu wurden 300 µl M4-Medium mit 50 mM Eisencitrat als Elektronenakzeptor und 50 mM Glukose als Elektronendonator in eine 96-Well Platte gegeben. Im Anschluss daran wurden die Einzelklone von einer Agarplatte mithilfe einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und jedes Well mit einem Klon inokuliert. Das Wachstum wurde mithilfe eines infinitePro 200 Spektrometers (Tecan, Männedorf, Schweiz) bei einer Wellenlänge von 655 nm stündlich gemessen.

Der Versuch wurde für die am schnellsten wachsenden Klone im Oktaplikat mit definierter Anfangs-OD<sub>655</sub> wiederholt. Hierfür wurden die Klone 4B, 6A, 6C, 9F, 9G und 10A gewählt und mit einer OD<sub>655</sub> von 0,29 im Oktaplikat in 96-Well Platten wie zuvor beschrieben angeimpft. Erneut wurde das Wachstum im Abstand von einer Stunde quantifiziert.

### III. Ergebnisse

#### 1. Biofilminduktion durch Riboflavin

Ziel der Arbeit war, eine neue Form des *Quorum sensings* basierend auf Riboflavin als Messenger-Molekül zu untersuchen. Hierbei war zunächst die spezifische Reaktion von *S. oneidensis* auf die Zugabe von Riboflavin von Interesse. Um diese zu untersuchen, wurden Transkriptomanalysen mit und ohne Zugabe von Riboflavin durchgeführt und miteinander verglichen. Des Weiteren war von Interesse, ab welcher Riboflavin-Konzentration eine gesteigerte Biofilmbildung in *S. oneidensis* induziert wird. Zuletzt sollte ermittelt werden, ob diese Riboflavin-Konzentration unter natürlichen Bedingungen erreicht werden kann. Die Ergebnisse zur Aufklärung dieser Fragestellungen sind im folgenden Abschnitt aufgeführt.

##### 1.1. Einfluss von Riboflavin auf die Genexpression

Um die Mechanismen der Biofilmbildung durch Riboflavin zu untersuchen, wurden *S. oneidensis* MR-1 WT-Zellen unter anoxischen Bedingungen mit und ohne die Zugabe von 37 nM Riboflavin kultiviert. Nach 5 h Wachstum wurden die Zellen geerntet und eine Transkriptomanalyse durchgeführt. Die Ergebnisse der Transkriptomanalyse sind in Tabelle 25 gezeigt. Die aus der Transkriptomanalyse resultierenden Ergebnisse wurden auf Signifikanz überprüft (*fold-change* < -2, > 2; FDR (*false discovery rate*) p-Wert  $\leq 0,05$ ). Wie Tabelle 25 entnommen werden kann, ist lediglich das Gen für die Ornithin-Decarboxylase *speC* etwa zweifach hochreguliert. Dagegen sind die Gene für die Sortase *srtA*, für den Methylcitrat-responsiven Regulator *prpR* und für die 2-Methylisocitrat Lyase *prpB* etwa um den Faktor 2 reprimiert. Der FDR-p-Wert, welcher die Wahrscheinlichkeit für das zufällige Auftreten der beobachteten Werte angibt, liegt bei allen signifikant regulierten Genen unter 0,005, was einer Wahrscheinlichkeit von unter 0,5 % entspricht.

## Ergebnisse

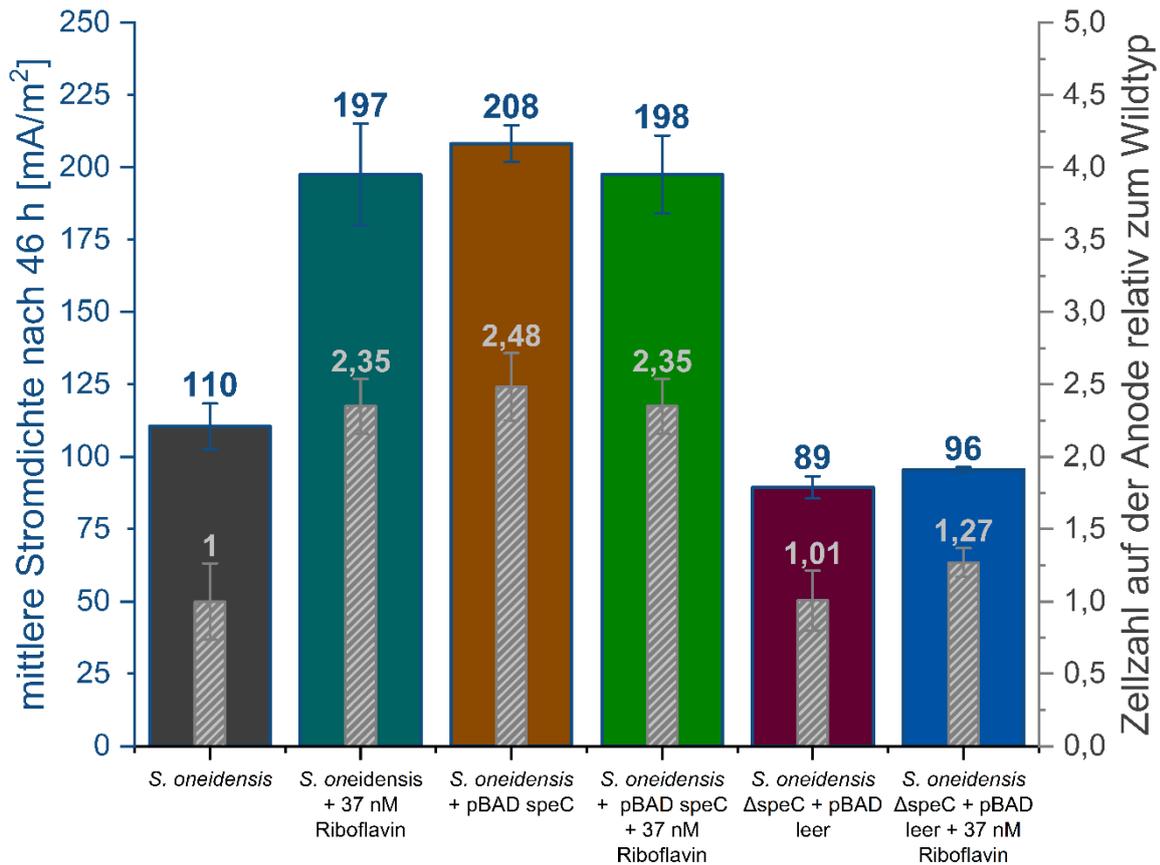
**Tabelle 25: Signifikant differentiell exprimierte Gene nach Riboflavin-Zugabe.** Gezeigt werden Gene mit einem FDR-p-Wert unter 0,05 und einem *fold-change* über 2 und unter -2. Für alle ausgewerteten Gene wurde der *fold-change* berechnet, indem der Wert bei Riboflavin-Zugabe durch den Wert der Probe ohne Riboflavin-Zugabe dividiert wurde. War die erhaltene Zahl kleiner als 1, so ist der negative Kehrwert aufgeführt (nach Edel *et al.*, 2021).

Gen	<i>fold-change</i> (FDR p-Wert)
Riboflavin-Zugabe gegen 0 nM Riboflavin-Zugabe	
<i>speC</i>	2,04 (1,92E-10)
<i>srtA</i>	-2,04 (4,24E-3)
<i>prpR</i>	-2,05 (6,61E-4)
<i>prpB</i>	-2,2 (2,86E-5)

### 1.2. Einfluss der durch Riboflavin regulierten Gene auf die Biofilmbildung und Stromproduktion in BES

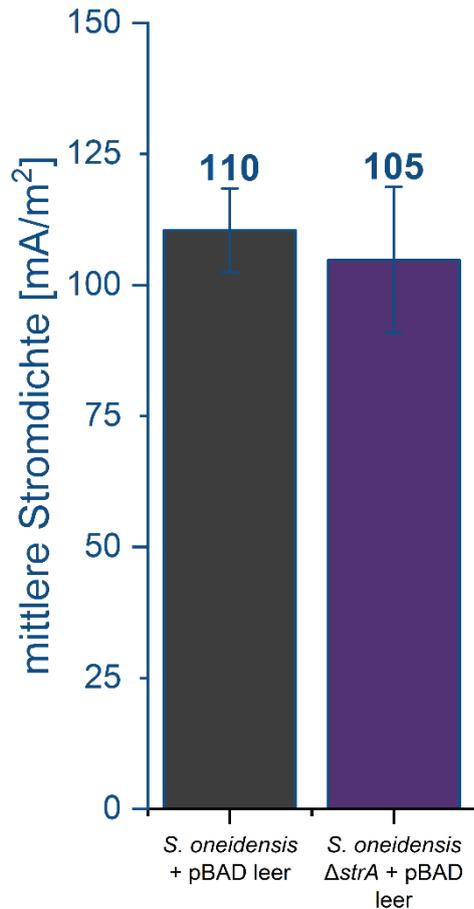
Um den Einfluss der Ornithin-Decarboxylase auf die Stromdichte und die Biofilmbildung zu untersuchen, wurden ein Deletionsstamm und ein Überexpressionsstamm erstellt. Zur Überexpression wurde das *multi-copy*-Plasmid pBAD verwendet. Die Stromdichten der Stämme sowie die Anzahl der Zellen auf der Anode sind in Abbildung 8 gezeigt. Um den Einfluss von Riboflavin auf die Stämme zu untersuchen, wurden 37 nM Riboflavin zugegeben. Wie in Abbildung 8 zu sehen ist, erhöht sich die mittlere Stromdichte durch Riboflavin-Zugabe innerhalb von 46 h um den Faktor 1,8 im Vergleich zu der Stromdichte des WT. Ebenso steigt die Anzahl der Zellen auf der Anode um den Faktor 2,35. Ein ähnlicher Effekt ist durch die Überexpression des Ornithin-Decarboxylase *speC* zu beobachten. Hier steigt die Stromdichte um den Faktor 1,9, während die Anzahl der Zellen auf der Anode um den Faktor 2,48 steigt. Eine weitere Zugabe von 37 nM Riboflavin zum *speC*-Überexpressionsstamm zeigt keinen signifikanten Effekt, weder auf die mittlere Stromdichte, noch auf die Anzahl der Zellen auf der Anode. Während die Überexpression von *speC* zu einem sehr ähnlichen Effekt führt wie die Zugabe von Riboflavin, zeigt die Deletion der Ornithin-Decarboxylase keine signifikante Änderung im Vergleich zum WT. So erreicht der Deletionsstamm eine mittlere Stromdichte von 89 mA/m<sup>2</sup>, während der WT eine Stromdichte von 110 mA/m<sup>2</sup> erreicht. Auch die Zellzahl an der Anode unterscheidet sich bei dem Deletionsstamm kaum von der Zellzahl des WT. Durch die Zugabe von 37 nM Riboflavin zu dem Deletionsstamm konnten keine signifikanten Veränderungen in Bezug auf Stromdichte oder Biofilmbildung im Vergleich zum WT festgestellt werden.

## Ergebnisse



**Abbildung 8: Mittlere Stromdichte unter Zugabe von Riboflavin sowie bei Überexpression und Deletion der Ornithin-Decarboxylase *speC* im Vergleich zu *S. oneidensis* WT.** Die blau umrandeten Balken zeigen die mittlere Stromdichte innerhalb von 46 h, während die grau schraffierten Balken die Zellzahl auf der Anode relativ zum WT zeigen (nach Edel *et al.*, 2021).

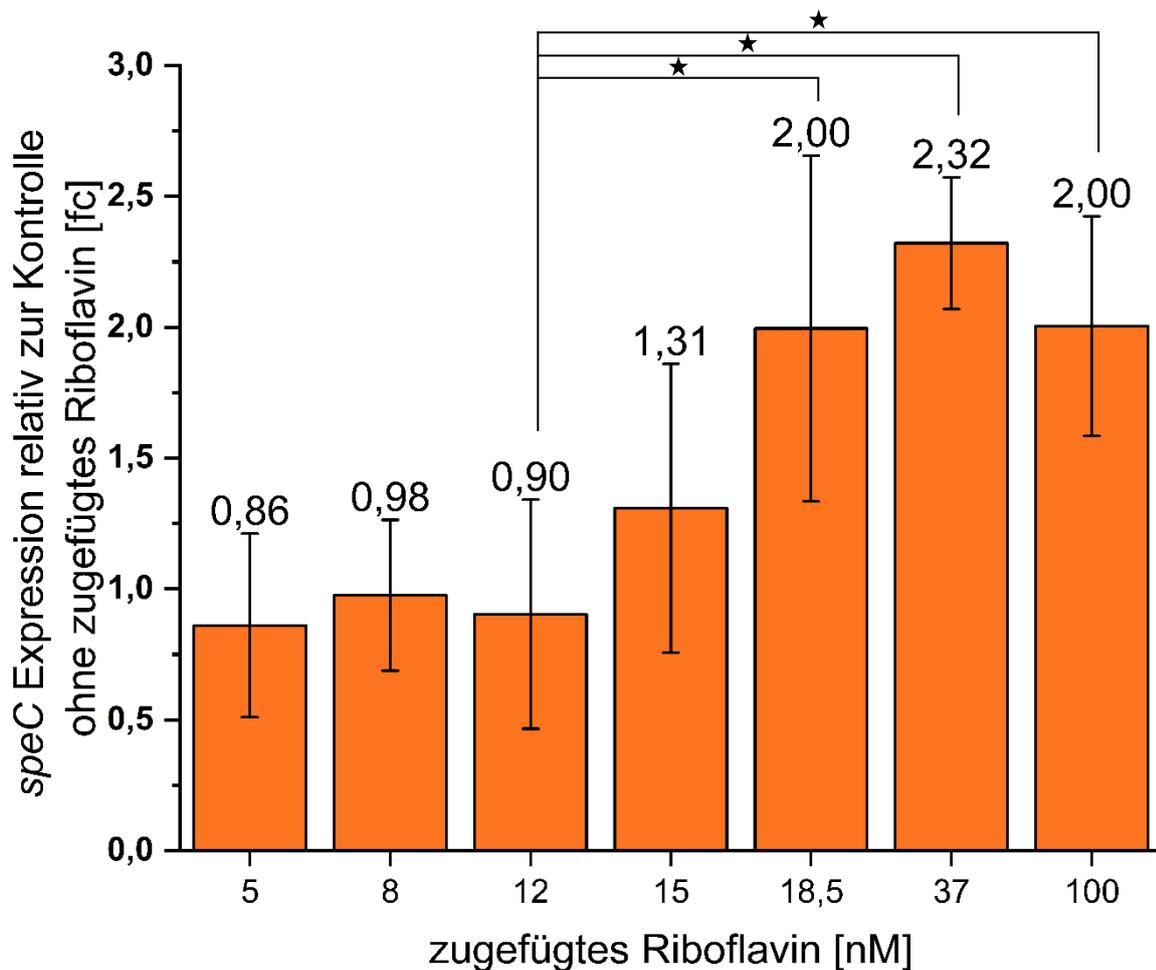
Neben der Ornithin-Decarboxylase *speC* wurden durch Zugabe von Riboflavin lediglich drei andere Gene signifikant reguliert. Unter diesen Genen war auch die Sortase *srtA*, welche etwa 2-fach reprimiert wurde. Um den Einfluss der Sortase auf die Stromdichte in BES zu überprüfen, wurde ein Deletionsstamm erstellt. In Abbildung 9 ist die Stromdichte des Deletionsstamms im Vergleich zum WT gezeigt. Wie in der Abbildung zu sehen ist, wird die Stromdichte aufgrund der Deletion der Sortase nicht beeinflusst. Die weiteren signifikant regulierten Gene konnten in dieser Arbeit nicht untersucht werden, da die Deletion des Methylcitrat-responsiven Regulators (*prpR*) und der 2-Methylisocitrat Lyase (*prpB*) nicht möglich war.



**Abbildung 9: Stromdichte bei Deletion der Sortase *srtA* im Vergleich zu *S. oneidensis* WT.** Gezeigt ist die mittlere Stromdichte nach 46 h (nach Edel *et al.*, 2021).

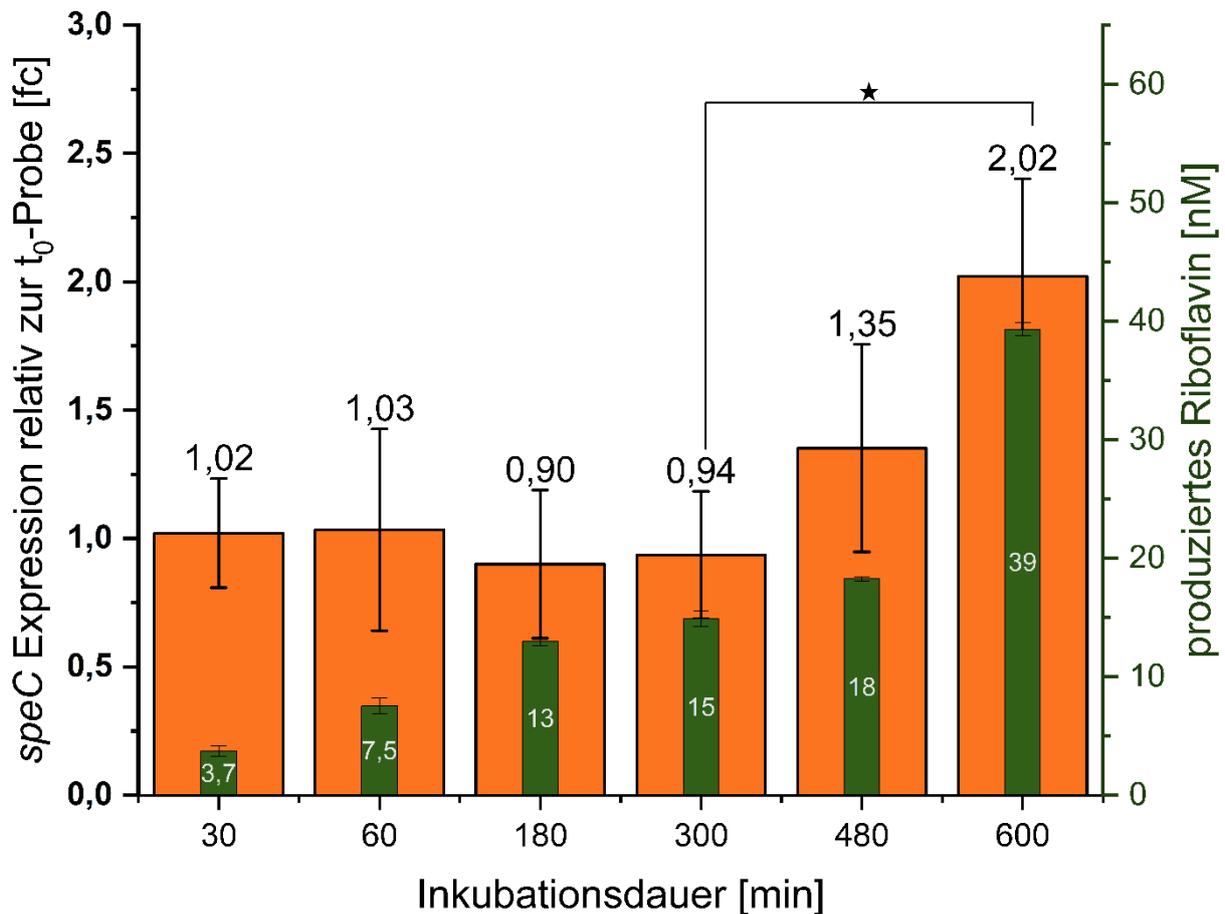
### 1.3. Einfluss verschiedener Riboflavin-Konzentrationen auf die Expression von *speC*

Um zu analysieren, welche minimale Konzentration benötigt wird, um die Expression von *speC* zu induzieren, wurden 5, 8, 12, 15, 18,5, 37 und 100 nM Riboflavin zu einer anoxisch in M4-Medium wachsenden Kultur gegeben. Nach 5 h wurden die Zellen geerntet, die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mithilfe einer quantitativen *real-time* PCR wurde die Anzahl der *speC*-Transkripte quantifiziert und auf das Haushaltsgen *rpoA* normalisiert. Die relative Anzahl der *speC*-Transkripte mit verschiedenen Riboflavin-Konzentrationen ist in Abbildung 10 gezeigt. Die Anzahl der *speC*-Transkripte bleibt bis zu einer Zugabe von 12 nM Riboflavin konstant. Ab einer Zugabe von 15 nM Riboflavin ist eine leichte Zunahme der Expression zu beobachten. Allerdings ist die Expression bei der Zugabe von 15 nM Riboflavin nicht signifikant höher als bei der Probe ohne Riboflavin Zugabe. Erst bei 18,5 nM Riboflavin-Zugabe ist die Expression von *speC* signifikant erhöht. Durch die Zugabe von 37 nM Riboflavin zeigt sich eine erneute leichte Zunahme der Expression, wobei die Steigerung im Vergleich zu der Expression bei 18,5 nM nicht signifikant ist. Bei Zugabe von 100 nM Riboflavin ist die Expression, ebenso wie bei 18,5 nM Riboflavin, verdoppelt.



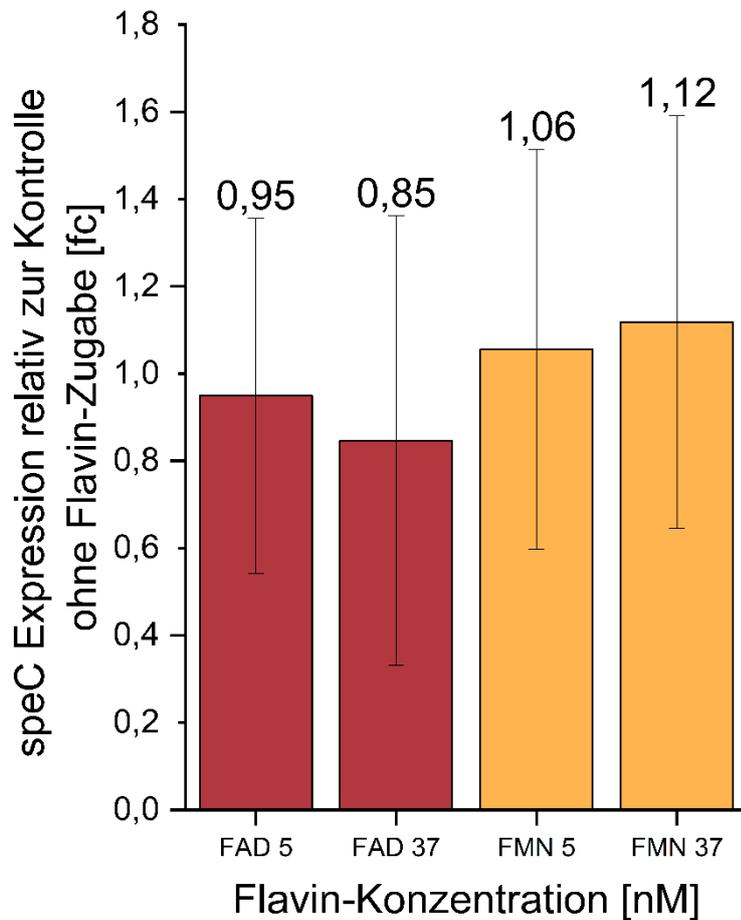
**Abbildung 10: Expression der Ornithin-Decarboxylase *speC* unter Zugabe von 5 – 100 nM Riboflavin.** Die Expression von *speC* wurde durch eine quantitative *real-time* PCR untersucht. Die Stämme wurden mit einer OD<sub>600</sub> von 0,07 angeimpft und 5 h inkubiert. Die Werte sind auf das Haushaltsgen *rpoA* normalisiert und relativ zu einer Probe ohne externe Riboflavin-Zugabe dargestellt. Die Sterne zeigen signifikante Unterschiede (*unpaired t-test*  $p < 0,5$ ) an. Die Expression von *speC* verdoppelt sich ab einer Zugabe von 18,5 nM Riboflavin (nach Edel *et al.*, 2021).

Da Riboflavin nur eine Relevanz als natürlicher Biofilm-Induktor haben kann, wenn die benötigten Konzentrationen zur Induktion von *speC* auch unter nativen Bedingungen erreicht werden, wurde nun überprüft, wann sich die Expression von *speC* ohne externe Zugabe von Riboflavin erhöht. Dazu wurden Proben einer Wachstumskurve mit einer Start-OD<sub>600</sub> von 0,2 in anoxischem M4-Medium untersucht. Die Proben wurden auf die Riboflavin-Konzentration und *speC*-Expression untersucht. Die Ergebnisse des Experiments sind in Abbildung 11 gezeigt. Nach 480 min Inkubationsdauer war eine leichte Steigerung der Expression zu beobachten. Zu diesem Zeitpunkt wurden 18 nM Riboflavin durch den Organismus produziert. Der Unterschied der *speC*-Expression ist zu diesem Zeitpunkt allerdings nicht signifikant. Erst nach 600 min und 39 nM produziertem Riboflavin ist eine signifikante Steigerung der *speC*-Expression zu beobachten.



**Abbildung 11: Einfluss des von *S. oneidensis* synthetisierten Riboflavins auf die Expression von *speC*.** Die schwarz umrandeten Balken geben die Expression von *speC* relativ zu einer t<sub>0</sub>-Probe an, während die grünen Balken die Konzentration des produzierten Riboflavins zum jeweiligen Zeitpunkt angeben. Die Stämme wurden mit einer OD<sub>600</sub> von 0,2 inokuliert und 6 h inkubiert. Um die Riboflavin-Konzentration und die *speC*-Expression zu untersuchen, wurden regelmäßig Proben genommen. Die Expressionswerte sind auf das Haushaltsgen *rpoA* normalisiert und relativ zu der t<sub>0</sub>-Probe dargestellt. Die Sterne zeigen signifikante Unterschiede (*unpaired t-test* p < 0,5) an. Die Expression von *speC* verdoppelt sich ab einer Inkubation von 600 min bei einer Riboflavin-Konzentration von 39 nM (nach Edel *et al.*, 2021).

Riboflavin ist nur eines von zahlreichen natürlich vorkommenden Flavinen. Bei der Synthese von Riboflavin durch *S. oneidensis* werden auch FAD und FMN freigesetzt (Covington *et al.*, 2010). Um zu überprüfen, ob diese beiden Flavine auch einen Effekt auf die Expression von *speC* haben, wurden Zellen unter Zugabe von FMN und FAD anoxisch mit einer Start-OD<sub>600</sub> von 0,07 in M4-Medium kultiviert. Nach einer Inkubation von 5 h wurden die Zellen geerntet, die RNA isoliert, revers-transkribiert und eine quantitative *real-time* PCR durchgeführt um die Expression von *speC* zu quantifizieren. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 gezeigt. Es wurden jeweils 5 und 37 nM der Flavine zugegeben. Beide Flavine haben keinen signifikanten Effekt auf die Expression von *speC*.



**Abbildung 12: Einfluss von FAD und FMN auf die Expression von *speC*.** Die Stämme wurden mit einer  $OD_{600}$  von 0,07 angeimpft und 5 h mit Zugabe der Flavine inkubiert. Die Expressionswerte sind auf das Haushaltsgen *rpoA* normalisiert und relativ zu einer Kontrolle ohne Flavin-Zugabe dargestellt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der *speC*-Expression festgestellt werden (nach Edel *et al.*, 2021).

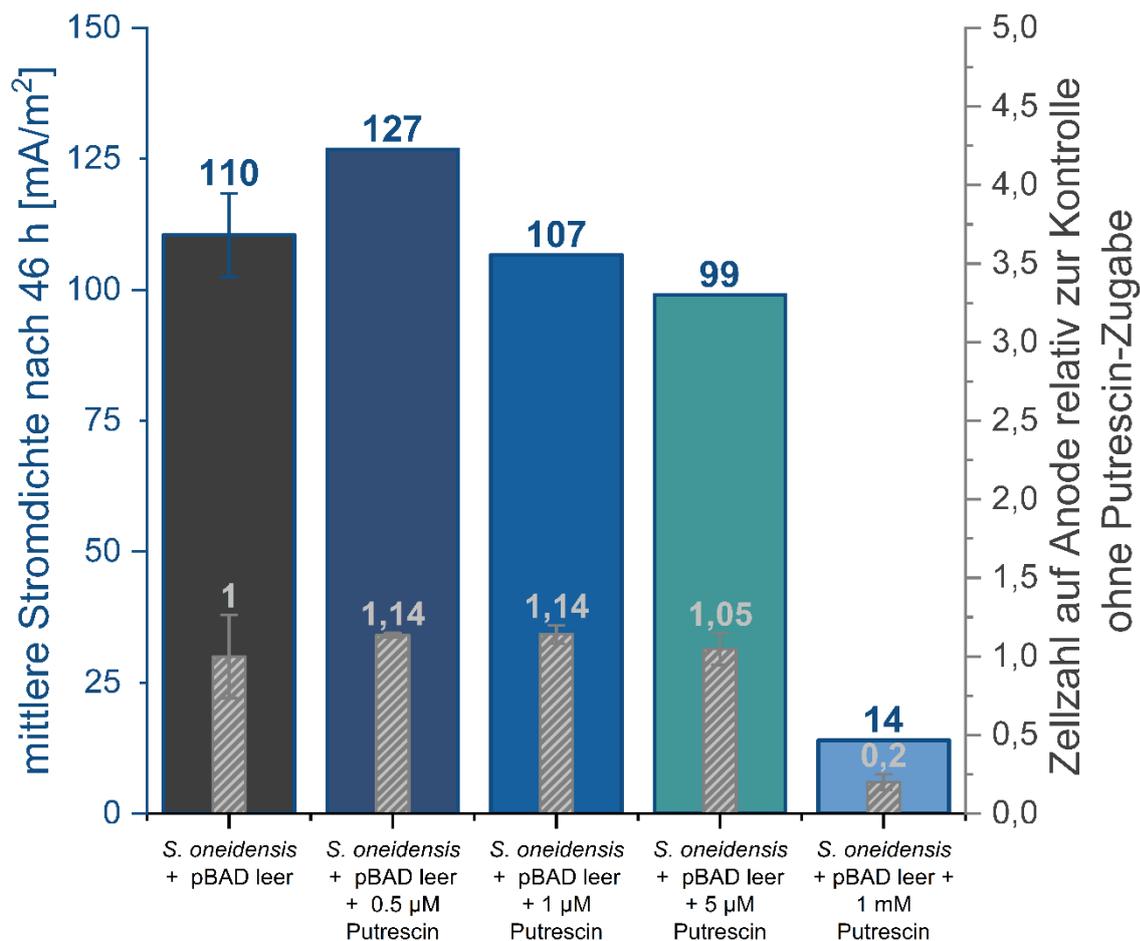
#### 1.4. Funktionsweise der Biofilmbildung durch Riboflavin

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass Riboflavin eine spezifische Induktion des *speC*-Promotors verursacht. Diese Induktion ist konzentrationsabhängig und wird auch unter natürlichen Wachstumsbedingungen ausgelöst. Da die Überexpression von *speC* einen vergleichbaren Phänotyp in BES auslöste wie die Zugabe von Riboflavin, war im Folgenden von Interesse, wie der Phänotyp zustande kommt. Dazu wurde zunächst die enzymatische Funktion von *speC* genauer betrachtet.

### 1.4.1. Einfluss von Putrescin auf Biofilmbildung und Stromdichte

Die Ornithin-Decarboxylase SpeC ermöglicht die Umwandlung von Ornithin zu Putrescin. Da in Prokaryoten bereits ein Zusammenhang zwischen vermehrter Biofilmbildung und gesteigerter Putrescin-Konzentration gezeigt werden konnte (Patel *et al.*, 2006; Karatan and Michael, 2013; Shi *et al.*, 2019), wurde im Folgenden der Einfluss von Putrescin auf die Biofilmbildung und die Stromdichte von *S. oneidensis*-Zellen in BES untersucht. Um den Einfluss von Putrescin zu ermitteln, wurden verschiedene Konzentrationen in BES mit *S. oneidensis* WT zugegeben. Die Stromdichte sowie die relative Zellzahl auf der Anode sind in Abbildung 13 gezeigt. Die Putrescin-Konzentration orientiert sich dabei an Experimenten mit Prokaryoten, bei denen die gewählten Putrescin-Mengen zu einer gesteigerten Biofilmbildung geführt haben (Shi *et al.*, 2019). Durch die Zugabe von 0,5 – 5  $\mu\text{M}$  Putrescin konnte allerdings im Fall von *S. oneidensis* keine Steigerung der Stromdichte oder der Biofilmbildung beobachtet werden. Die Zugabe von 1 mM Putrescin führt zu einer Abnahme der Stromdichte von  $110 \text{ mA/m}^2$  zu  $14 \text{ mA/m}^2$ . Auch die Anzahl der Zellen auf der Anode sank um 80 %. Um mehrere Konzentrationsbereiche abdecken zu können, wurden die Experimente in diesem Fall lediglich im Unikat durchgeführt. Daher ist bei den mittleren Stromdichten keine Standardabweichung gezeigt. Die Standardabweichung der relativen Zellzahl auf der Anode entstammt den technischen Quadruplikaten.

## Ergebnisse



**Abbildung 13: Einfluss von Putrescine auf die Stromdichte und Biofilmbildung von *S. oneidensis* WT in BES.** Die Experimente wurden bis auf den WT-Vergleich im Unikat durchgeführt. Die blau umrandeten Balken geben die mittlere Stromdichte innerhalb von 46 h an, während die grauen Balken die relative Zellzahl auf der Anode angeben. Die Zugabe von Putrescine im Konzentrationsbereich von 0,5 – 5 µM zeigt keine Veränderung der Stromdichte oder der Biofilmbildung. Die Zugabe von 1 mM Putrescine führt zur Abnahme der Stromdichte von 110 mA/m<sup>2</sup> auf 14 mA/m<sup>2</sup>. Ebenso sinkt die Anzahl der Zellen auf der Anode durch die Zugabe von 1 mM Putrescine um 80 % (nach Edel *et al.*, 2021).

### 1.4.2. Proteom-Regulation durch *speC*-Überexpression

Da die Zugabe des Endprodukts der direkten katalytische Funktion von SpeC keinen positiven Effekt auf die Biofilmbildung oder die Stromdichte in BES zeigte, stellte sich die Frage, ob die *speC*-Überexpression einen Einfluss auf das Zellproteom haben könnte. Um dies genauer zu untersuchen, wurde ein Proteom von *S. oneidensis* WT sowie von *S. oneidensis* + pBAD *speC* erstellt und miteinander verglichen. Die beiden Stämme wurden in anoxischem M4-Medium mit einer OD<sub>600</sub> von 0,2 kultiviert und nach 5 h geerntet. Die Zellen wurden aufgeschlossen und das Proteom der beiden Stämme analysiert (siehe II.5.5. Proteomanalyse). Die signifikant regulierten Proteine durch die *speC* Überexpression sind in Tabelle 26 aufgeführt.

## Ergebnisse

Es wurden insgesamt 37 Proteine durch die Überexpression von *speC* signifikant reguliert. Unter den regulierten Proteinen befinden sich einige die Funktionen in der Aminosäure-Synthese haben. Obwohl viele der differentiell regulierten Proteine nicht mit der gesteigerten Biofilmbildung in Verbindung gebracht werden konnten, ist bereits bekannt, dass sowohl WbpP als auch ProQ einen Einfluss auf die Bildung von Biofilm haben können (Creuzenet *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2006; Niou *et al.*, 2009; Sheidy and Zielke, 2013; Lee *et al.*, 2013). ProQ ist ein posttranskriptioneller Regulator, welcher in *E. coli* einen positiven Einfluss auf die Bildung von Biofilm hat. Das Protein wird durch die Überexpression von *speC* mit einem  $\log_2$ -fold-change von 2,08 hochreguliert. WbpP ist eine mögliche Uridindiphosphat-N-Acetylglukosamin-C4-Epimerase. Das Gen von *wbpP* formt mit dem Gen für die Uridindiphosphat-N-Acetyl-D-Glukosamin-Dehydrogenase *wbpA* ein Operon. WbpA ist in der Proteomanalyse ebenso leicht hochreguliert, allerdings ist die Zunahme von WbpA nicht statistisch signifikant und daher nicht in Tabelle 26 aufgeführt. WbpP wird mit einem  $\log_2$ -fold-change von 1,23 hochreguliert. Aus *Vibrio vulnificus* ist bereits bekannt, dass eine Überexpression von *wbpP* einen positiven Effekt auf die Biofilmbildung hat (Park *et al.*, 2006). Die angegebenen Funktionen stammen aus den UniProt und KEGG Datenbanken (The UniProt Consortium, 2021; Kanehisa und Goto, 2000).

## Ergebnisse

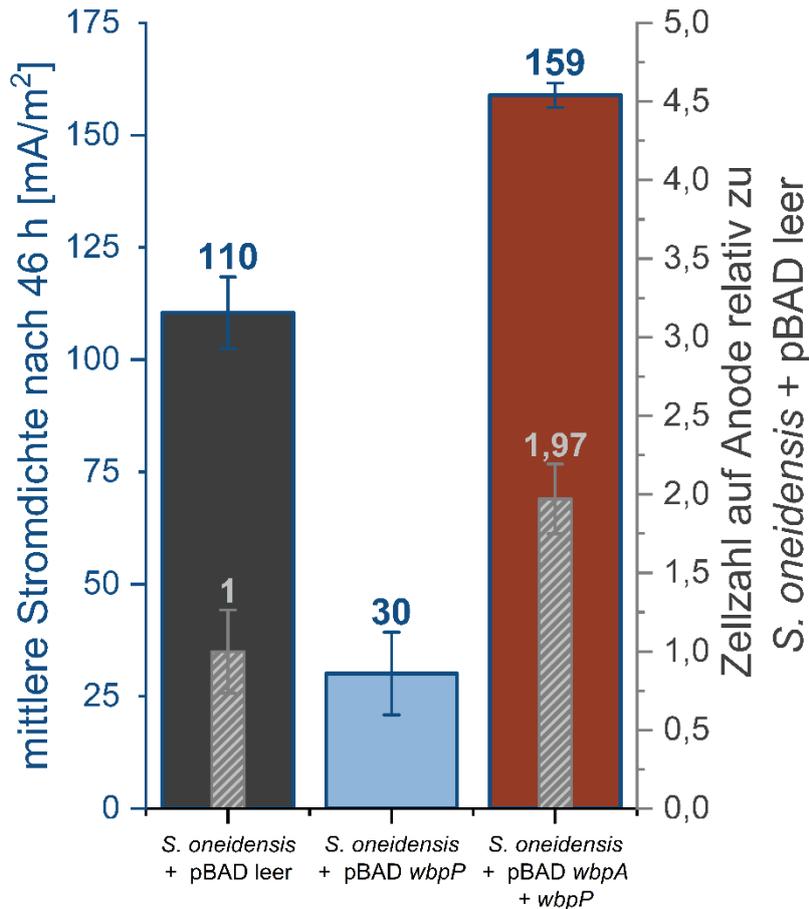
**Tabelle 26: Signifikant regulierte Proteine durch die Überexpression der Ornithin-Decarboxylase *speC*.** Proteine mit einem p-value < 0.05 und einem  $\log_2\text{-fold-change}$  > 1 und < -1 sind gezeigt. Grüne Zeilen geben hochregulierte Proteine an, während rote Zeile reprimierte Proteine angeben (nach Edel *et al.*, 2021).

<b>Protein</b>	<b><math>\log_2\text{-fold-change}</math> (p-value)</b> <i>speC</i> -Überexpression gegen WT	<b>Funktion</b>
SpeC	9,65 (5E-06)	Ornithin-Decarboxylase
SO_3964	4,09 (0,0445)	Nukleotid-Bindeprotein
ArgB	3,22 (2E-06)	Arginin-Biosynthese
SO_0576	2,5 (2E-05)	ATPase
DctP	2,32 (0,0026)	Nukleotid-Metabolismus
IvdG	2,32 (0,0208)	Fettsäuresynthese
ProQ	2,08 (0,0308)	posttranskriptionelle Regulation
SO_3698	1,75 (0,0426)	periplasmatisches Protein
ThiL	1,7 (8E-06)	Thiamin-Biosynthese
SO_4371	1,67 (0,0215)	Synthetase/Ligase
GarR	1,64 (0,0005)	Oxidoreduktase
PuuA	1,53 (0,0002)	Polyamin-Synthese
AdhB	1,53 (0,0003)	Alkohol-Dehydrogenase
LeuB	1,49 (0,0117)	Leucin-Biosynthese
Tpx	1,46 (0,0175)	Thiol-Peroxidase
HemL	1,4 (0,0003)	Porphyrin-Biosynthese
YebR	1,31 (0,0445)	Oxidoreduktase
MetH	1,26 (0,0349)	Methionin-Biosynthese
WbpP	1,23 (0,0004)	Isomerase
SelD	1,14 (0,0009)	Kinase, Transferase
RmlA	1,09 (0,0017)	Extrazelluläre Polysaccharid- Biosynthese
Upp	1,06 (0,0045)	Glykosyltransferase
TrpA	1,03 (9E-05)	Tryptophan-Biosynthese
SO_2766	-1,09 (0,0047)	Peptidase
SO_1059	-1,27 (0,0114)	Alanin-Biosynthese
AguB	-1,29 (0,0008)	Putrescin-Amidase
SO_4378	-1,33 (0,0004)	FAD-Bindeprotein
SO_A0051	-1,35 (0,0004)	nicht charakterisiertes Protein
SO_0695	-1,43 (0,0262)	Kalium-Export in innerer Membran
Rnr	-1,46 (0,0007)	Ribonuklease
SO_4429	-1,57 (0,0309)	mögliches periplasmatisches Protein
SO_0491	-1,66 (0,0195)	Proteinverarbeitung
SO_3119	-1,97 (6E-05)	nicht charakterisiertes Protein
SO_2636	-2,01 (0,0027)	Protein der Cupin 4 Familie
SO_1208	-2,02 (0,0021)	Nukleotidyl-Transferase in innerer Membran
SO_1674	-2,25 (0,0218)	Dehydrogenase
RpoE	-2,69 (0,0391)	RNA Polymerase sigma Faktor

### **1.5. Einfluss der Epimerase WbpP auf die Biofilmbildung und Stromdichte in BES**

Da eine Überexpression der UDP-N-Acetylglucosamin-C4-Epimerase bereits in Zusammenhang mit vermehrter Biofilmbildung in *V. vulnificus* gebracht werden konnte, wurde im Folgenden der Einfluss von WbpP auf die Biofilmbildung und die Stromdichte in *S. oneidensis* untersucht. Hierzu wurde *wbpP* zur Überexpression in ein pBAD-Plasmid integriert und der resultierende Stamm in BES analysiert. Da *wbpP* zusammen mit *wbpA*, dem Gen für eine Uridindiphosphat-N-Acetyl-D-Glukosamin-Dehydrogenase, in einem Gencluster zu finden ist wurde zusätzlich der Einfluss der Überexpression beider Gene untersucht. Hierzu wurden beide Gene in ein pBAD-Plasmid kloniert und der resultierende Stamm anschließend in BES analysiert. In Abbildung 14 sind die Ergebnisse des Experiments zu sehen. Die Überexpression von *wbpP* alleine zeigt eine um 66 % verringerte Stromdichte. Dagegen zeigt *S. oneidensis* + pBAD *wbpA wbpP* eine um 44,5 % erhöhte Stromdichte. Von den Stromdichten ausgehend war insbesondere die Biofilmbildung von *S. oneidensis* + pBAD *wbpA wbpP* interessant. Daher wurde die DNA von der Anode isoliert und die Zellzahl mittels qPCR relativ zum WT bestimmt (siehe II.4.4.3. Quantitative Polymerasekettenreaktion). Wie in Abbildung 14 zu sehen, ist die Zellzahl auf der Anode durch die Überexpression von *wbpA* und *wbpP* um 97 % erhöht.

## Ergebnisse



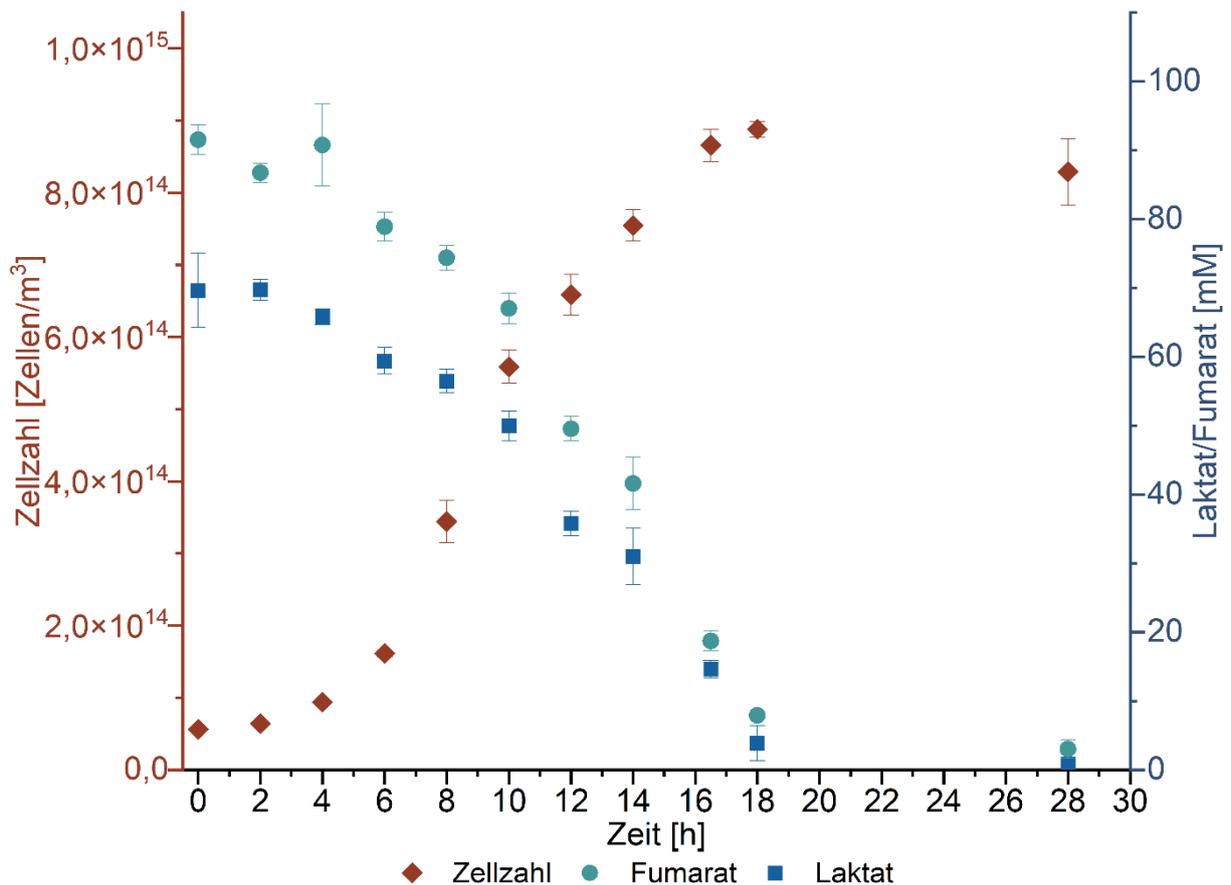
**Abbildung 14: Einfluss von *wbpP* und *wbpA* auf die Stromdichte und Biofilmbildung von *S. oneidensis* in BES.** Die blau umrandeten Balken zeigen die mittlere Stromdichte innerhalb von 46 h, während die grau schraffierten Balken die Zellzahl auf der Anode relativ zum WT zeigen. Die Stromdichte sinkt durch die alleinige Überexpression von *wbpP* um 66 %, während die Überexpression von *wbpA* und *wbpP* zu einer Steigerung der Stromdichte 44,5 % führt. Die Anzahl der Zellen auf der Anode steigt dabei um 97 % (nach Edel *et al.*, 2021).

### 1.6. Native Riboflavin-Produktion von *S. oneidensis* planktonisch und im Biofilm

Die vorangehenden Experimente zeigen, dass Riboflavin eine spezifische Biofilmbildung von *S. oneidensis* induziert. Ebenso konnte in III.1.3 (siehe III.1.3. Einfluss verschiedener Riboflavin-Konzentrationen auf die Expression von *speC*) bereits gezeigt werden, dass die nötigen Riboflavin-Konzentrationen auch durch den Organismus selbst synthetisiert werden können. Um das Verhältnis der synthetisierten Flavin-Spezies im Verlauf des Wachstums zu untersuchen, wurde die Zusammensetzung der sekretierten Flavine zunächst unter planktonischen Bedingungen und im Anschluss im Biofilm analysiert. Das Wachstum unter planktonischen Bedingungen fand in anoxischem M4-Medium über 28 h statt. Der Wachstumsverlauf sowie der Laktat- und Fumarat-Abbau können Abbildung 15 entnommen werden. Um die Flavin-Bildung zu analysieren, wurden regelmäßig Proben genommen und mittels HPLC auf ihre Flavin-Zusammensetzung hin untersucht. Die Ergebnisse der Analyse können Abbildung 16 entnommen werden. Wie in Abbildung 15 zu sehen ist, geht das

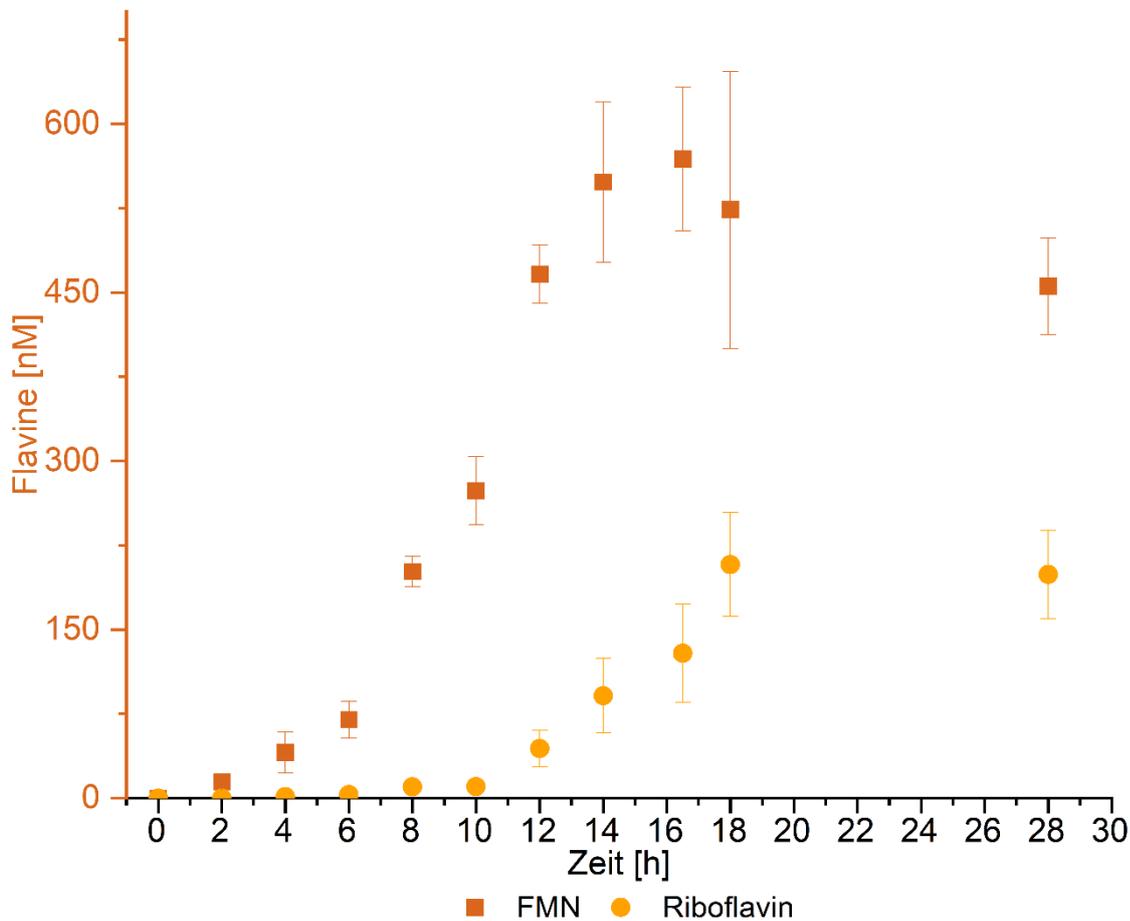
## Ergebnisse

Wachstum nach 6 h in die exponentielle Phase über. Nach etwa 18 h sind der Elektronendonator und der Elektronenakzeptor aufgebraucht und *S. oneidensis* geht in die stationäre Wachstumsphase über. Im Vergleich des Wachstums aus Abbildung 15 mit der Flavin-Produktion aus Abbildung 16 fällt auf, dass FMN bereits in frühen Wachstumsphasen gebildet wird. Erst ab 10 h nach Inokulation sind geringe Mengen Riboflavin messbar. Während des kompletten Wachstums überwiegt die Konzentration an gebildetem und sekretiertem FMN im Überstand deutlich. Nach 18 h wurden 524 nM FMN und dagegen nur 208 nM Riboflavin gebildet und sekretiert. In der stationären Wachstumsphase werden keine weiteren Flavine mehr gebildet, die Konzentration der Flavinspezies nimmt sogar leicht ab auf einen Wert von 456 nM FMN und 199 nM Riboflavin.



**Abbildung 15: Wachstum und Substratabbau von *S. oneidensis* WT unter anoxischen Bedingungen.** Nach 6 h erreicht *S. oneidensis* WT die exponentielle Wachstumsphase. Nach 18 h sind sowohl Elektronendonator als auch Elektronenakzeptor aufgebraucht und die stationäre Wachstumsphase wird erreicht (nach Edel *et al.*, 2021).

## Ergebnisse

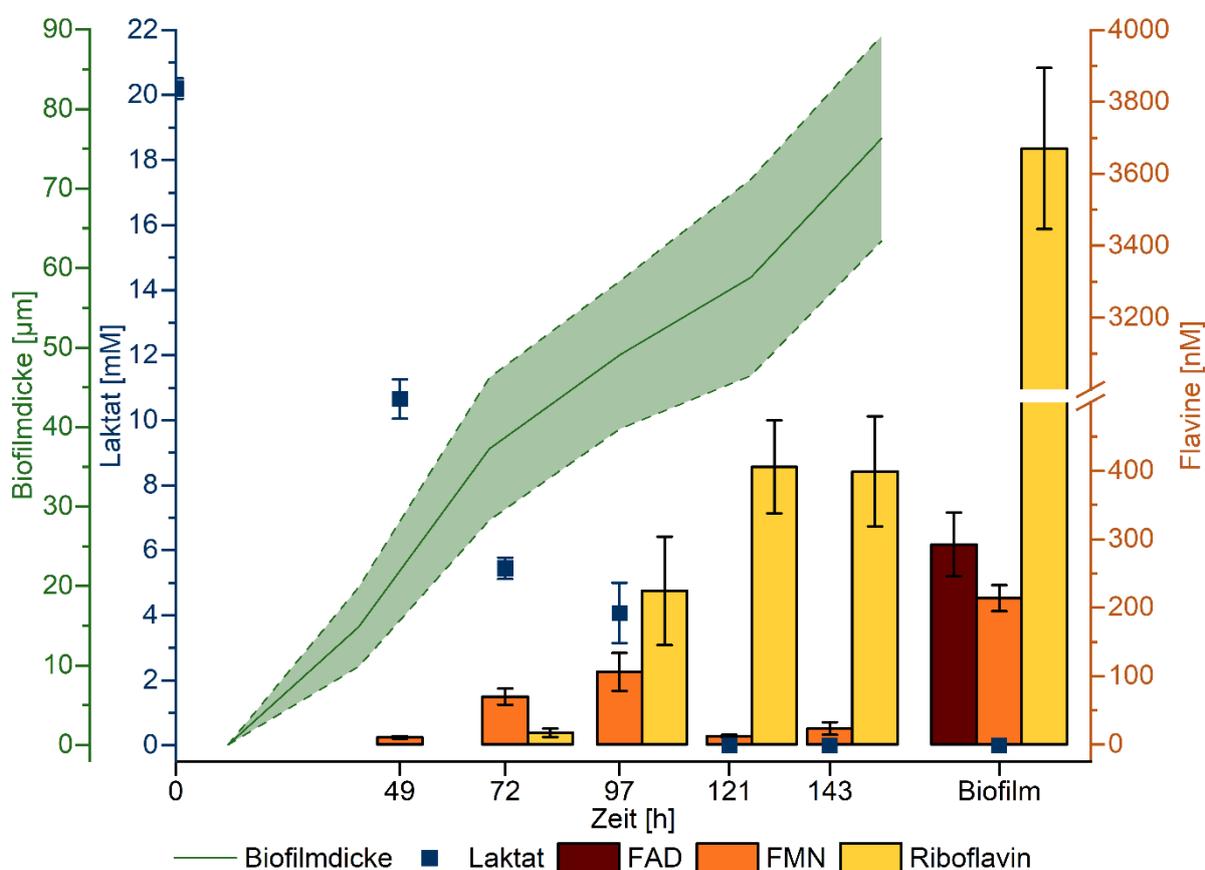


**Abbildung 16: Flavin-Produktion und -Sekretion von *S. oneidensis* WT unter anoxischen Bedingungen.** Bereits nach 2 h sind geringe Mengen FMN messbar. Riboflavin ist erst nach 10 h in geringen Mengen nachweisbar. Insgesamt ist etwa 2,5-mal so viel FMN messbar wie Riboflavin. Nach 18 h steigen die Flavin-Konzentrationen nicht weiter und nehmen bis Stunde 28 leicht ab (nach Edel *et al.*, 2021).

Da sich das Wachstum unter planktonischen Bedingungen grundlegend vom Wachstum im Biofilm unterscheidet, wurden im Folgenden die Konzentrationen der Flavine in einem *S. oneidensis* WT Biofilm untersucht. Der Biofilm wurde dazu in einer mikrofluidischen PDMS-Kultivierungs-Plattform angezogen (siehe II.7.2. Wachstum des Biofilms in mikrofluidischen Kultivierungs-Plattformen). Das Wachstum des Biofilms wurde durch eine OCT-Messung quantifiziert. Des Weiteren wurden im Durchfluss die Konzentrationen der Flavine sowie die Laktat-Konzentration bestimmt. Die Ergebnisse des Experiments sind in Abbildung 17 gezeigt. Der Biofilm zeigt ein deutliches Wachstum auf bis zu 76  $\mu\text{m}$  nach 43 h. Danach wurde der Biofilm geerntet und die Konzentrationen der Flavine innerhalb des Biofilms bestimmt. Ein Vergleich der Flavin-Produktion des Biofilms mit der Flavin-Produktion der planktonischen Zellen (siehe Abbildung 16) zeigt, dass das Verhältnis von Riboflavin zu FMN im Biofilm deutlich erhöht ist im Vergleich zu planktonischen Zellen. Während im

## Ergebnisse

planktonischen Wachstum hauptsächlich FMN sekretiert wird, findet im Biofilm hauptsächlich Riboflavin-Sekretion statt. Dabei wird durch den Biofilm bis zu 17-fach mehr Riboflavin als FMN sekretiert. Auch innerhalb des Biofilms ist etwa 17-mal mehr Riboflavin als FMN detektierbar. So konnten im Biofilm nach 143 h 3671 nM Riboflavin detektiert werden, dagegen lediglich 213 nM FMN. Innerhalb des Biofilms konnte auch FAD detektiert werden. Die Konzentration ist mit 292 nM innerhalb derselben Größenordnung wie die FMN-Konzentration.



**Abbildung 17: Biofilmwachstum, Flavin-Produktion und Substratabnahme eines *S. oneidensis* WT Biofilms.** Innerhalb von 143 h wächst der Biofilm auf eine Dicke von 76 µm. Während des Biofilmwachstums wird hauptsächlich Riboflavin sekretiert. Nach 143 h ist die Riboflavin-Konzentration im Durchfluss bei 399 nM. Innerhalb des Biofilms konnte eine Konzentration von 3671 nM Riboflavin detektiert werden (nach Edel *et al.*, 2021).

## 2. Erweiterung des Produkt- und Substratspektrums mit optimierter Raum-Zeit-Ausbeute

Um den Anwendungsbereich von *S. oneidensis* als Produktionsorganismus zu erweitern, sollte der Stamm an Glukose als Substrat in BES angepasst werden. Es wurde bereits gezeigt, dass

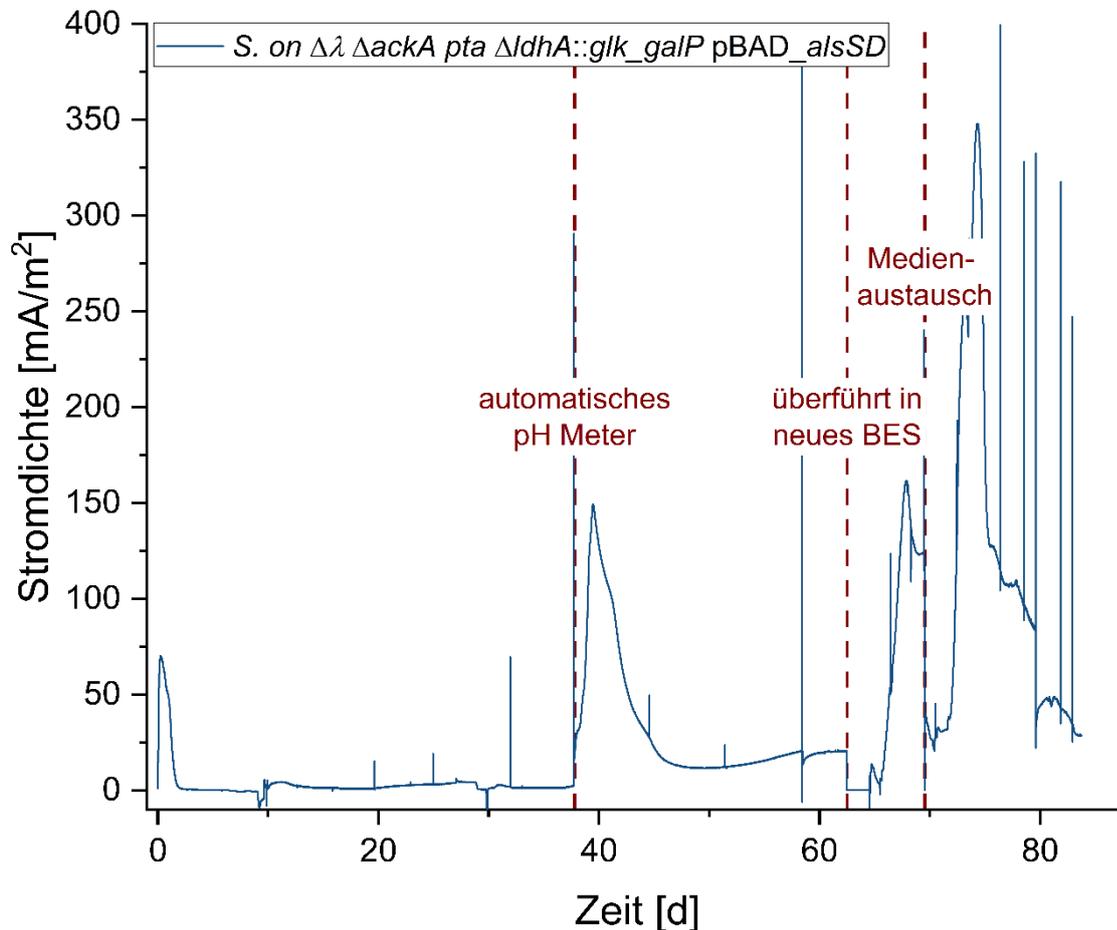
die Expression des Glukose-Importers *galP* sowie der Glukokinase *glk* die Verwendung von Glukose als Substrat durch *S. oneidensis* ermöglichen (Choi *et al.*, 2014; Nakagawa *et al.*, 2015). Allerdings sind die Substratumsatzraten sehr gering. Des Weiteren wird bei einem Elektronenüberschuss vermehrt Laktat produziert. Um die Umsatzraten und die Produktausbeute zu optimieren, wurde daher der Genotyp des Produktionsstammes angepasst und im Anschluss durch eine Langzeitadaptation an die Bedingungen adaptiert.

### 2.1. Stammentwicklung und Adaptation

Die Stammentwicklung wurde aufgebaut auf *S. oneidensis*  $\Delta\lambda$   $\Delta$ *ackA pta*, welcher in einer vorangegangenen Arbeit durch Thea Bursać erstellt wurde (Bursać, 2015). Zusätzlich wurden die für den Glukose-Abbau benötigten Gene *galP* und *glk* in den Lokus der Laktatdehydrogenase *ldhA* unter dem nativen Promotor von *cctA* eingefügt. Um die Synthese von Acetoin als Endprodukt zu ermöglichen, wurde zudem ein pBAD-Plasmid mit den Genen für die Acetolaktat-Synthase *alsS* und die Acetolaktat-Decarboxylase *alsD* erstellt. Da das pBAD-Plasmid einen Arabinose-induzierbaren Promotor trägt, welcher durch die Zugabe von Glukose reprimiert wird, wurde der Promotor durch den nativen Promotor von *cctA* ersetzt. Der so generierte und durch Sequenzierung verifizierte Stamm wurde in einer Langzeitadaptation in einem BES eingesetzt.

Die Adaptation wurde in anoxischem M4-Medium mit 50 mM Glukose und einer OD<sub>600</sub> von 1,1 inokuliert. Die erreichte Stromdichte ist in Abbildung 18 gezeigt. Bereits zu Beginn der Adaptation war der pH-Wert instabil und musste nach 26 Tagen mit NaOH justiert werden. Um im folgenden Versuchsablauf gleichmäßigere Bedingungen zu gewährleisten, wurde an Tag 37 eine automatische pH-Regulierung in den Versuchsaufbau eingesetzt. Diese sollte bei einem pH-Wert unter 6 durch die Zugabe von 0,5 M NaOH den pH-Wert auf 7 justieren. Nach Einsetzen der automatischen pH-Regulierung stieg die Stromdichte zunächst auf 150 mA/m<sup>2</sup> und erreichte nach etwa 45 Tagen einen stabilen Wert von 15 mA/m<sup>2</sup>. Allerdings stieg der pH-Wert nach Einbau der automatischen pH-Regulierung deutlich und erreichte nach 58 Tagen ein Maximum von pH 8,9. Durch das Überführen von 10 ml Flüssigkultur in ein neues BES nach 62,5 Tagen wurde die automatische pH-Regulierung aus dem System entfernt und der pH-Wert sank auf 7,4. Ebenso sank durch das Überführen die OD<sub>600</sub> von 0,37 auf 0,13. Die Stromdichte stieg nach insgesamt 68 Tagen deutlich auf ein Maximum von 160 mA/m<sup>2</sup>. Durch den Austausch des Mediums an Tag 70 wurden alle nicht an der Anode angehefteten Bakterien ausgespült und neues Substrat in das System eingebracht. Daraufhin stieg die Stromdichte bis auf ein Maximum von 347 mA/m<sup>2</sup>. Allerdings waren sowohl der pH-Wert als auch die

Stromdichte weiterhin instabil. Um die weitere Charakterisierung zu vereinfachen, wurde im Folgenden mit Einzelklonen weitergearbeitet. Diese entstammen der initialen Adaptation nach Tag 83 und wurden über Verdünnungsreihen auf LB-Agarplatten vereinzelt.



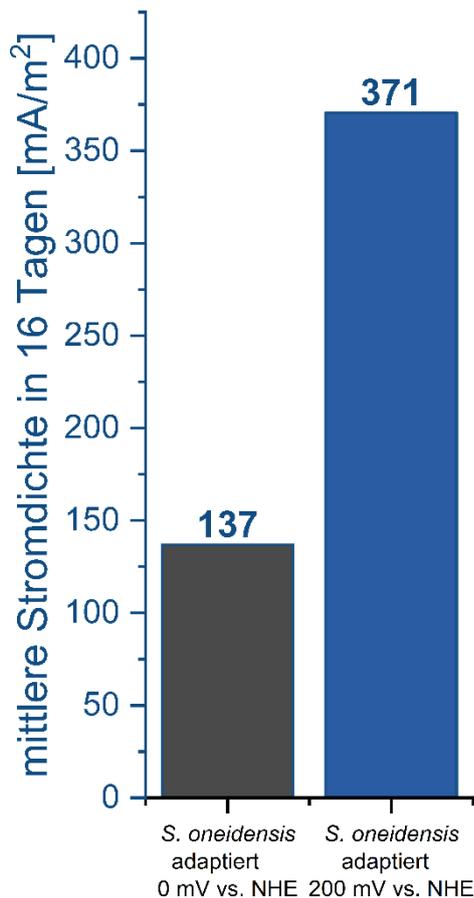
**Abbildung 18: Stromdichte der Adaptation von *S. oneidensis*  $\Delta\lambda$   $\Delta ackA$   $pta$   $\Delta dhA::glk\_galP$   $pBAD\_alsSD$  auf Glucose in BES.** Die Adaptation fand über einen Zeitraum von 83 Tagen statt. Nach 37 Tagen wurde eine automatische pH-Regulierung in das System eingebracht. Nach 63 Tagen wurden 10 ml der initialen Kultur in ein neues BES überführt. Nach 70 Tagen wurde das Medium abgegossen und durch neues Medium ersetzt. Die Adaptation wurde nach 83 Tagen beendet.

## 2.2. Einfluss des Anodenpotentials auf das Endproduktspektrum

Die so entstandenen 87 Einzelklone wurden zunächst als Mischkultur auf ihr Endproduktspektrum untersucht. Hierzu wurde die LB-Agarplatte geschwemmt und in zwei BES mit M4-Medium und 50 mM Glukose inokuliert. Da die Wahl des Anodenpotentials einen entscheidenden Einfluss auf die Zusammensetzung des Endproduktspektrums haben kann (Pinchuk *et al.*, 2008; Kasai *et al.*, 2019), wurde jeweils ein BES mit einem Anodenpotential von 0 mV gegen NHE und ein BES mit einem Anodenpotential von 200 mV gegen NHE

## Ergebnisse

betrieben. Die mittlere Stromdichte der beiden Experimente ist in Abbildung 19 gezeigt. Das Endproduktspektrum wurde mittels HPLC analysiert und ist in Tabelle 27 aufgeführt. Die Stromdichte ist durch das Anlegen eines Potentials von 200 mV gegen NHE deutlich erhöht. So erreichte die gleiche Mischkultur durch das höhere Anodenpotential eine um den Faktor 2,7 erhöhte Stromdichte. Dagegen ist das Endproduktspektrum mit beiden Anodenpotentialen sehr vergleichbar. In beiden Versuchen werden ähnliche Glukose-Konzentrationen innerhalb von 16 Tagen verbraucht. Die Pyruvat-Akkumulation der Versuche unterscheidet sich leicht. Durch das erhöhte Anodenpotential werden statt 6,2 mM Pyruvat 13 mM Pyruvat synthetisiert. Die Konzentrationen der anderen gemessenen Endprodukte sind in beiden Versuchen sehr ähnlich. Bei beiden Potentialen war kein Acetoin messbar.



**Abbildung 19: Mittlere Stromdichte der Mischkultur aus 87 adaptierten *S. oneidensis* Klonen nach 16 Tagen bei einem Potential von 0 mV gegen NHE und 200 mV gegen NHE. Die mittlere Stromdichte steigt durch das höhere Potential um den Faktor 2,7 an.**

## Ergebnisse

**Tabelle 27: Substratverbrauch und Produktkonzentration der Mischkultur aus 87 adaptierten *S. oneidensis* Klonen nach 16 Tagen bei einem Potential von 0 mV gegen NHE und 200 mV gegen NHE.** Der Substratverbrauch, sowie die Produktakkumulation sind in beiden Versuchsansätzen ähnlich. Lediglich die Konzentration von Pyruvat ist bei einem Potential von 200 mV gegen NHE deutlich höher.

Substrat/Produkt	Substratverbrauch/Produktkonzentration [mM]	
	0 mV gegen NHE	200 mV gegen NHE
Glukose	43	47
Pyruvat	6,2	13
Succinat	2,8	3,5
Laktat	49	49
Acetat	11	13

Neben den Endprodukten wurde auch der Ertrag berechnet, also das Verhältnis der Endprodukte zu Glukose. Die Berechnung basiert auf dem Verhältnis der Kohlenstoffatome. Der Ertrag der Einzelprodukte sowie der Gesamt-Ertrag sind in Tabelle 28 aufgeführt. Der Ertrag betrug bei dem Versuch mit erhöhtem Anodenpotential 0,8 mol/mol, was einer Umwandlungsrate von 80 % der Glukose in Endprodukte entspricht. Bei dem Versuch mit einem Anodenpotential von 0 mV vs NHE betrug der Ertrag 0,77 mol/mol und entspricht damit einer Umwandlungsrate von 77 %.

**Tabelle 28: Ertrag der Mischkultur aus 87 adaptierten *S. oneidensis* Klonen nach 16 Tagen bei einem Potential von 0 mV gegen NHE und 200 mV gegen NHE.** Es wurde zunächst der Ertrag der Einzelprodukte betrachtet. Der Gesamt-Ertrag ergibt sich aus der Addition der Einzel-Erträge.

Produkt	Anzahl C-Atome	Ertrag [mol Produkt/mol Substrat x Anzahl der C-Atome des Moleküls]	
		0 mV gegen NHE	200 mV gegen NHE
Pyruvat	3	0,07	0,14
Succinat	4	0,04	0,05
Laktat	3	0,57	0,52
Acetat	2	0,09	0,09
Gesamt-Ertrag		0,77	0,8

Neben dem Ertrag war ebenso die coulombsche Effizienz interessant. Diese gibt an, wie viel Prozent der freiwerdenden Elektronen auf die Anode übertragen werden. Zur Ermittlung der coulombschen Effizienz wurde die folgende Formel verwendet:

## Ergebnisse

$$CE = \frac{\int_0^t I}{N_A * \epsilon * \Delta c * z_e * V_R}$$

$I$  = Stromstärke [C]

$N_A$  = Avogadro-Konstante [ $N_A = 6,022 * 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ ] (Lide, 2010)

$\epsilon$  = Elementarladung [ $\epsilon = 1,602 * 10^{-9} \text{ C}$ ] (Lide, 2010)

$c$  = Konzentration des Endprodukts

$z_e$  = Überschuss metabolischer Elektronen

$V_R$  = Reaktorvolumen

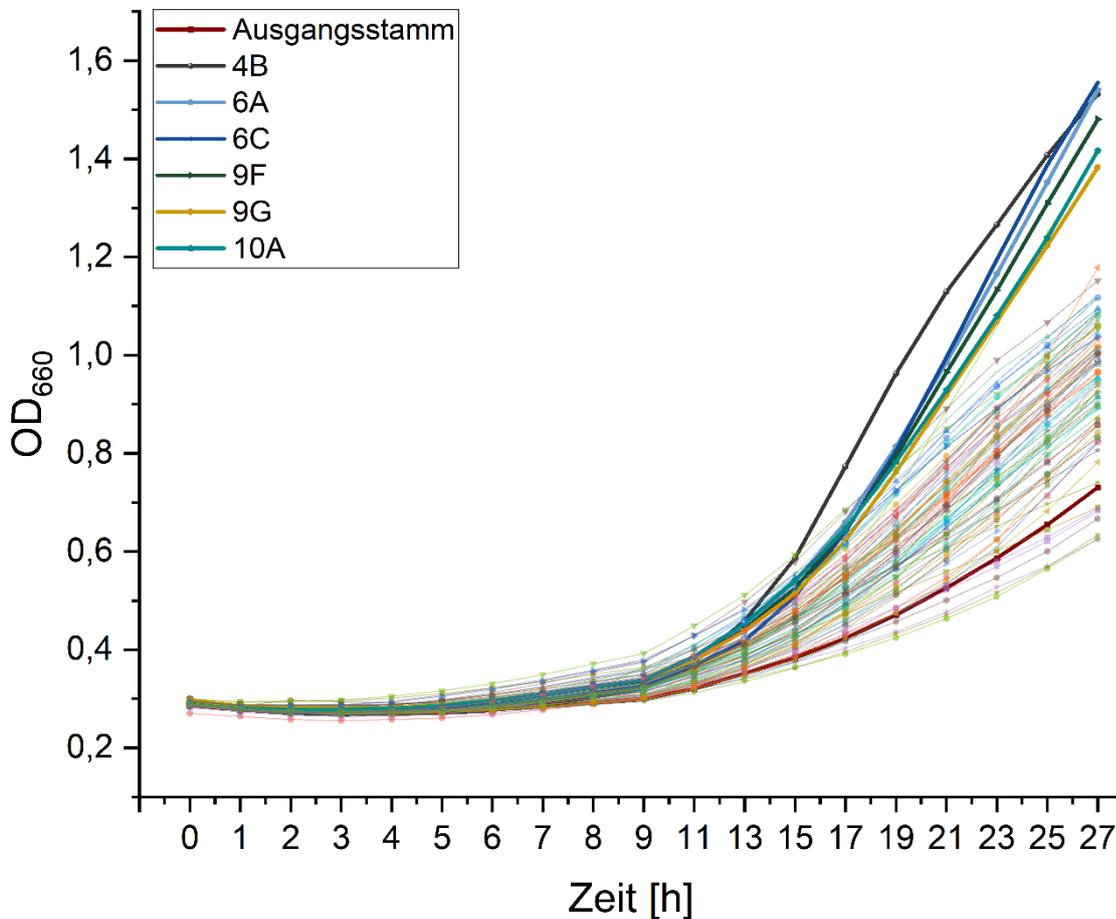
Aufgrund des gemischten Endproduktspektrums wurde betrachtet, wie viele Elektronen bei dem jeweiligen Produkt frei wurden. Diese wurden für die entstandenen Produkte aufsummiert. Die Berechnung der coulombschen Effizienz ergab für den Versuch mit einem Anodenpotential von 0 mV vs NHE einen Wert von 20 % und für das erhöhte Anodenpotential einen Wert von 40 %.

Nachdem der Einfluss verschiedener Anodenpotentiale auf das Endproduktspektrum marginal war, wurde das Wachstum der 87 Einzelklone auf Eisencitrat genauer analysiert.

### 2.3. Wachstum adaptierter Einzelklone auf Eisencitrat

Um die adaptierten *S. oneidensis* Klone genauer zu charakterisieren, wurde die Wachstumsgeschwindigkeit auf Eisencitrat untersucht. Dazu wurden 300  $\mu\text{l}$  des M4-Mediums mit 50 mM Glukose und 50 mM Eisencitrat steril in einer 96-Well Platte beimpft. Daraufhin wurde das Wachstum von 87 Einzelklonen über die Absorption bei 660 nm analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 dargestellt. Zur besseren Übersicht wurden die Klone, welche im Folgenden näher analysiert wurden, hervorgehoben. In Dunkelrot ist das Wachstum des Ausgangsstamms zu sehen, welcher zu Beginn der Adaptation in das BES eingesetzt wurde. In grau, hellblau, dunkelblau, dunkelgrün, gelb und türkis sind die Klone zu sehen, die das schnellste Wachstum auf Eisencitrat aufwiesen und damit für weitere Analysen am vielversprechendsten schienen. Diese Klone befanden sich an den Positionen 4B, 6A, 6C, 9F, 9G und 10A in der 96-Well-Platte und werden im Folgenden zur leichteren Unterscheidung nach ihrer jeweiligen Position benannt.

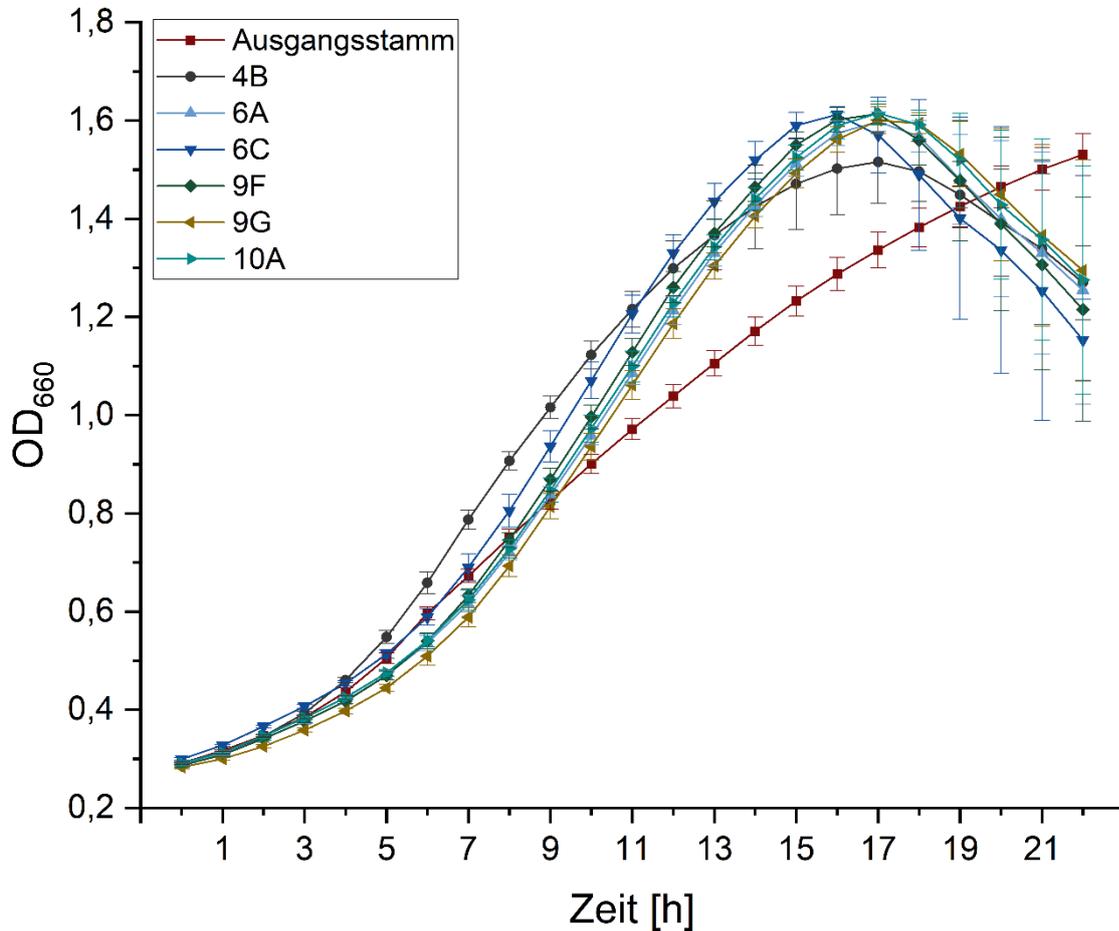
## Ergebnisse



**Abbildung 20: Wachstum der adaptierten Klone auf M4-Eisencitrat-Medium im Vergleich zum Ausgangsstamm.** Untersucht wurden 87 adaptierte Klone im Unikat. Die 6 Klone 4B, 6A, 6C, 9F, 9G und 10A zeigten ein deutlich schnelleres Wachstum und wurden für weitere Analysen verwendet.

Da die Klone bei der initialen Untersuchung des Wachstums lediglich im Unikat und mit undefinierter Anfangszellzahl auf ihr Wachstum hin untersucht wurden, wurde der Versuch mit den vielversprechendsten Klonen im Oktaplikat wiederholt. Dazu wurden die zu untersuchenden Einzelklone zunächst in LB-Medium kultiviert, dreimal mit M4-Medium ohne Elektronenakzeptor und Elektronendonator gewaschen und mit einer Start- $OD_{660}$  von 0,29 in 300  $\mu$ l M4-Eisencitrat-Medium inokuliert. Das Wachstum der Klone ist in Abbildung 21 zu sehen. Die maximale Wachstumsrate ist in Tabelle 29 aufgeführt. Die *lag*-Phase ist bei allen untersuchten Klonen ähnlich lang, allerdings ist das Wachstum der adaptierten Klone deutlich schneller, als das des Ausgangsstamms. Die adaptierten Klone erreichen bereits nach etwa 17 h die maximale optische Dichte, während der Ausgangsstamm nach 22 h noch kein Maximum in der optischen Dichte zeigt. Die maximalen Wachstumsraten der adaptierten Klone unterscheiden sich nicht signifikant von der maximalen Wachstumsrate des Ausgangsstamms.

## Ergebnisse



**Abbildung 21: Wachstum der adaptierten Klone auf M4-Eisencitrat-Medium im Oktaplikat im Vergleich zum Ausgangsstamm.** Das Medium wurde mit einer  $OD_{660}$  von 0,29 beimpft und das Wachstum wurde stündlich gemessen. Die adaptierten Klone erreichen bereits nach etwa 17 h die maximale Optische Dichte, während der Ausgangsstamm sich nach 22 h noch im Wachstum befindet.

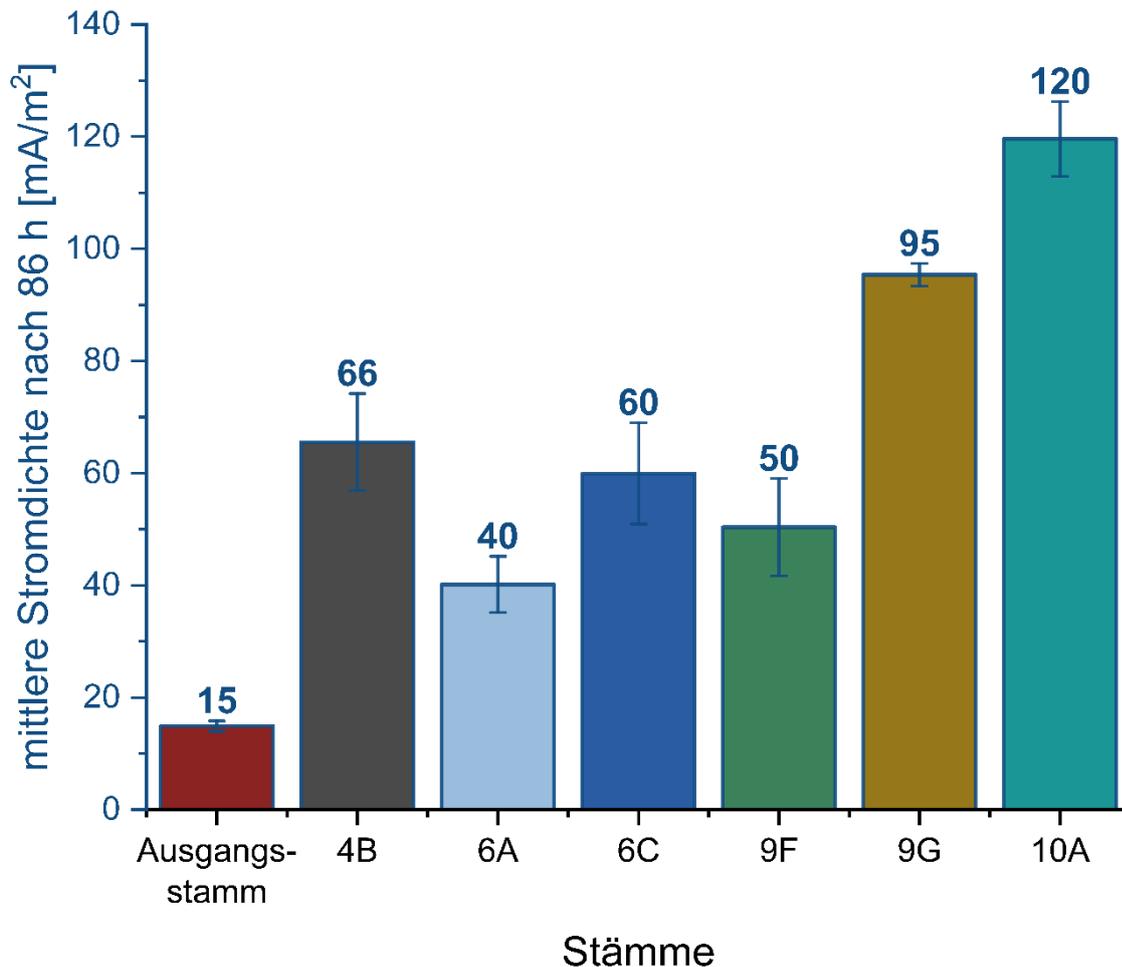
**Tabelle 29: maximale Wachstumsrate der adaptierten Klone auf M4-Eisencitrat-Medium.** Es ist kein signifikanter Unterschied der maximalen Wachstumsraten festzustellen.

Stamm	Maximale Wachstumsrate [ $\text{min}^{-1}$ ]
Ausgangsstamm	$0,0028 \pm 2,88 \cdot 10^{-4}$
4B	$0,0031 \pm 2,09 \cdot 10^{-4}$
6A	$0,0026 \pm 2,54 \cdot 10^{-4}$
6C	$0,0026 \pm 2,77 \cdot 10^{-4}$
9F	$0,0027 \pm 3,14 \cdot 10^{-4}$
9G	$0,0027 \pm 2,75 \cdot 10^{-4}$
10A	$0,0026 \pm 3,22 \cdot 10^{-4}$

### **2.4. Stromdichte und Biofilmbildung adaptierter Einzelklone**

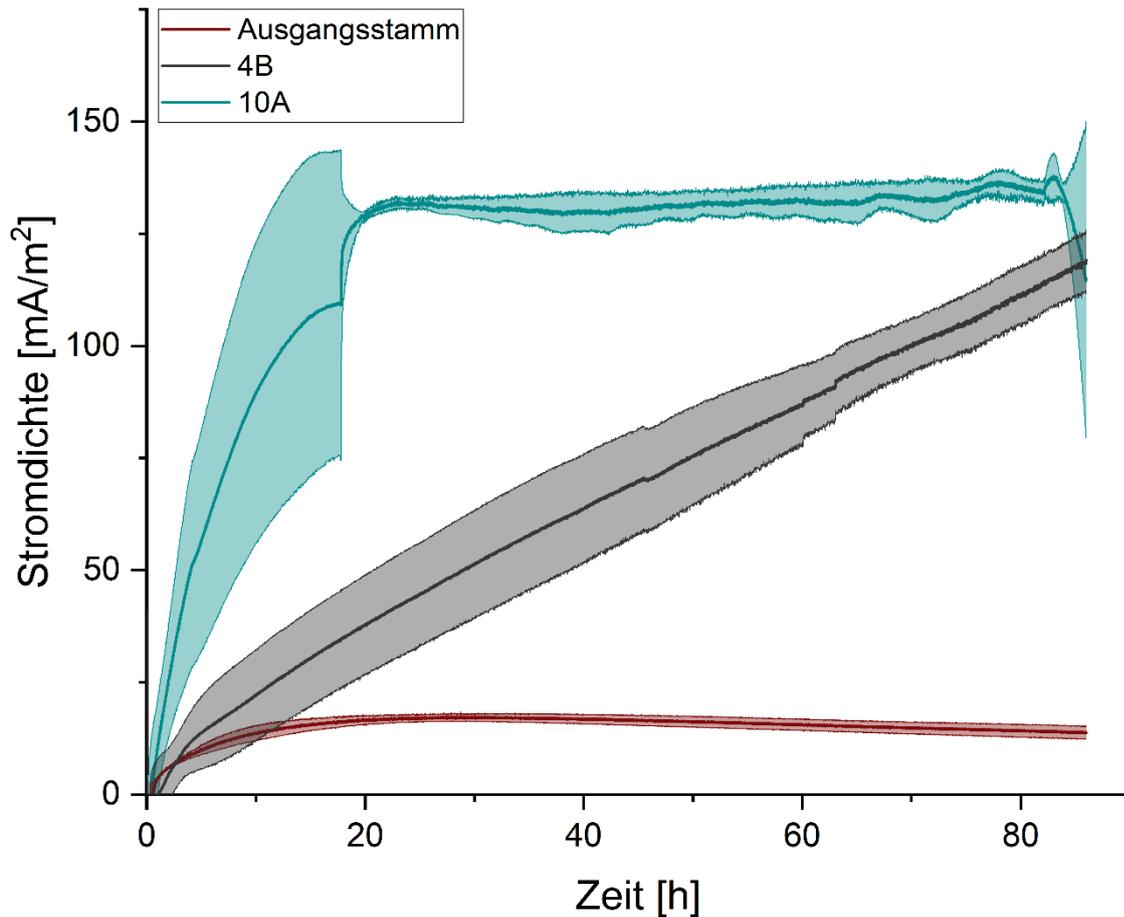
Um Verbesserungen in Bezug auf die Stromdichte der adaptierten Klone zu untersuchen, wurden die 6 vielversprechendsten adaptierten Klone im Triplikate in BES untersucht. Die mittleren Stromdichten innerhalb von 86 h sind in Abbildung 22 zu sehen. Alle adaptierten Klone zeigten deutlich erhöhte Stromdichten im Vergleich zum Ausgangsstamm. Dabei erreichte Klon 6A mit  $40 \text{ mA/m}^2$  die geringste Stromdichte der adaptierten Klone. Die von Klon 6A erreichte Stromdichte ist allerdings dennoch 2,7-mal höher als die des Ausgangsstamms. Die zweitniedrigste Stromdichte wurde durch Klon 9F erreicht, welcher mit  $50 \text{ mA/m}^2$  eine 3,3-fach höhere Stromdichte als der Ausgangsstamm erreichte. Ähnliche Stromdichten erreichten Klon 4B und Klon 6C, welche  $66 \text{ mA/m}^2$  und  $60 \text{ mA/m}^2$  produzierten. Klon 9G erreichte mit  $95 \text{ mA/m}^2$  die zweithöchste Stromdichte, während Klon 10A mit  $120 \text{ mA/m}^2$  die höchste mittlere Stromdichte erreichte. Im Vergleich der von Klon 10A generierten Stromdichte zu der von *S. oneidensis* WT mit Laktat als Elektronendonator wird deutlich, dass Klon 10A ähnliche Stromdichten erreicht wie *S. oneidensis* WT mit Laktat als Elektronendonator (vgl. Abbildung 8).

## Ergebnisse



**Abbildung 22: Mittlere Stromdichte und Biofilmbildung der adaptierten Klone in 86 h im Vergleich zum Ausgangsstamm.** Die Balken zeigen die mittlere Stromdichte der Einzelklone. Alle adaptierten Klone weisen eine deutlich höhere Stromdichte als der Ausgangsstamm auf. Die höchste mittlere Stromdichte wird durch Klon 10A mit 120 mA/m<sup>2</sup> erreicht.

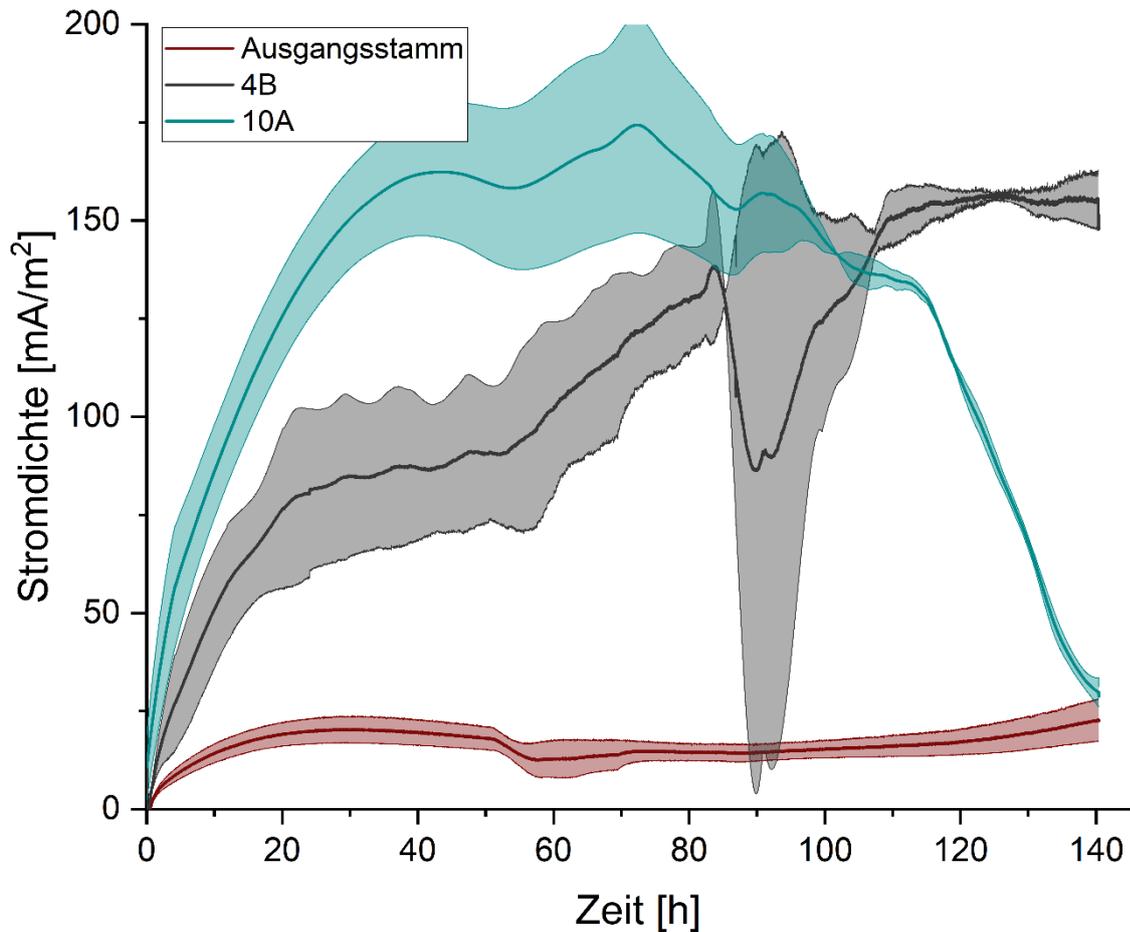
Nach der Analyse in BES waren zwei der adaptierten Klone von besonderem Interesse: Klon 10A, aufgrund der 8-fachen Steigerung der Stromdichte und Klon 4B, dessen Stromkurve sich im Verlauf von den anderen Stromkurven deutlich unterschied. Der übliche Verlauf einer Stromkurve mit *S. oneidensis*-Kulturen beinhaltet eine kurze *lag*-Phase, eine kurze exponentielle Phase und nach etwa 24 h das Erreichen eines Plateaus, welches konstant gehalten wird. Im Fall von Klon 4B ist der Verlauf der Stromkurve abgeändert. Wie in Abbildung 23 zu sehen, steigt die Stromdichte bei Klon 4B innerhalb der ersten 86 h kontinuierlich. Dies resultierte in der zweithöchsten maximalen Stromdichte der adaptierten Klone.



**Abbildung 23: Verlauf der Stromkurven von Klon 10A und 4B im Vergleich zum Ausgangsstamm in 86 h.** Während Klon 10A und Klon 4B bereits nach 24 h eine stabile Stromdichte erreichen, steigt die Stromdichte von Klon 4B kontinuierlich innerhalb der 86 h.

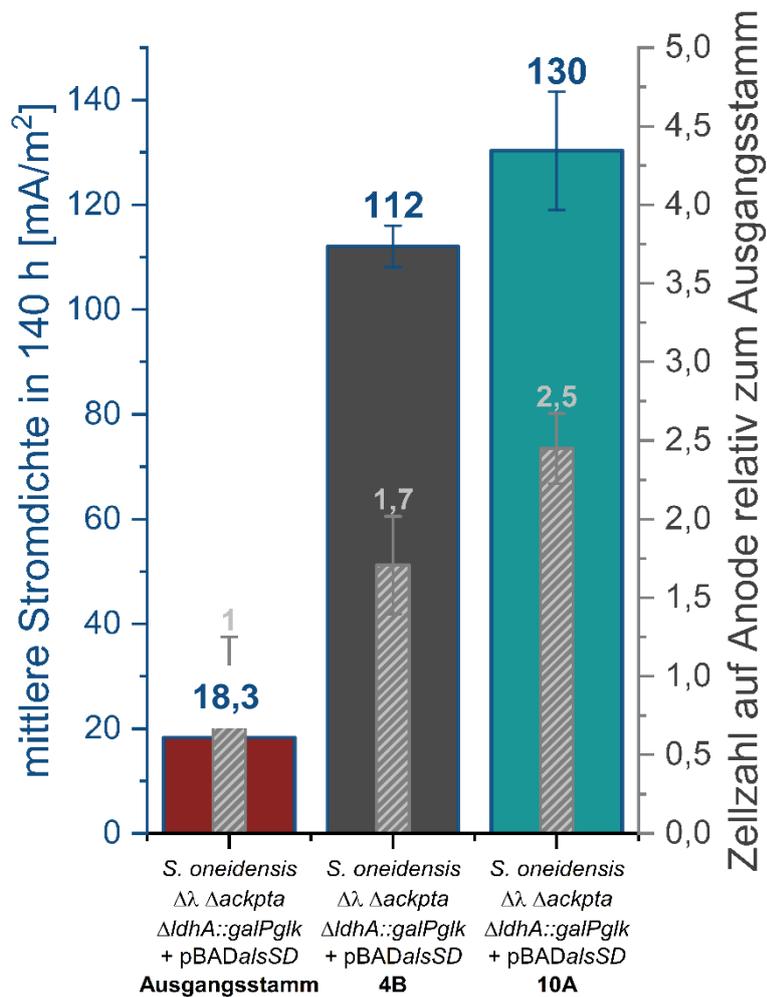
Um zu untersuchen, nach welcher Zeit die Stromdichte von Klon 4B die stationäre Phase erreicht und um die Biofilmbildung des Ausgangsstamms sowie der Klone 4B und 10A zu untersuchen, wurden die BES-Experimente mit den genannten Klonen über einen Zeitraum von 140 h wiederholt. Der Verlauf der Stromkurven ist in Abbildung 24 gezeigt.

Wie bereits im vorangegangenen Experiment erreicht Klon 10A nach etwa 24 h eine konstante Stromdichte von etwa  $150 \text{ mA/m}^2$ . Dagegen erreicht Klon 4B erst nach etwa 110 h eine konstante Stromdichte. Diese liegt ebenfalls bei etwa  $150 \text{ mA/m}^2$ . Der Ausgangsstamm erreicht etwa 15 bis  $20 \text{ mA/m}^2$ .



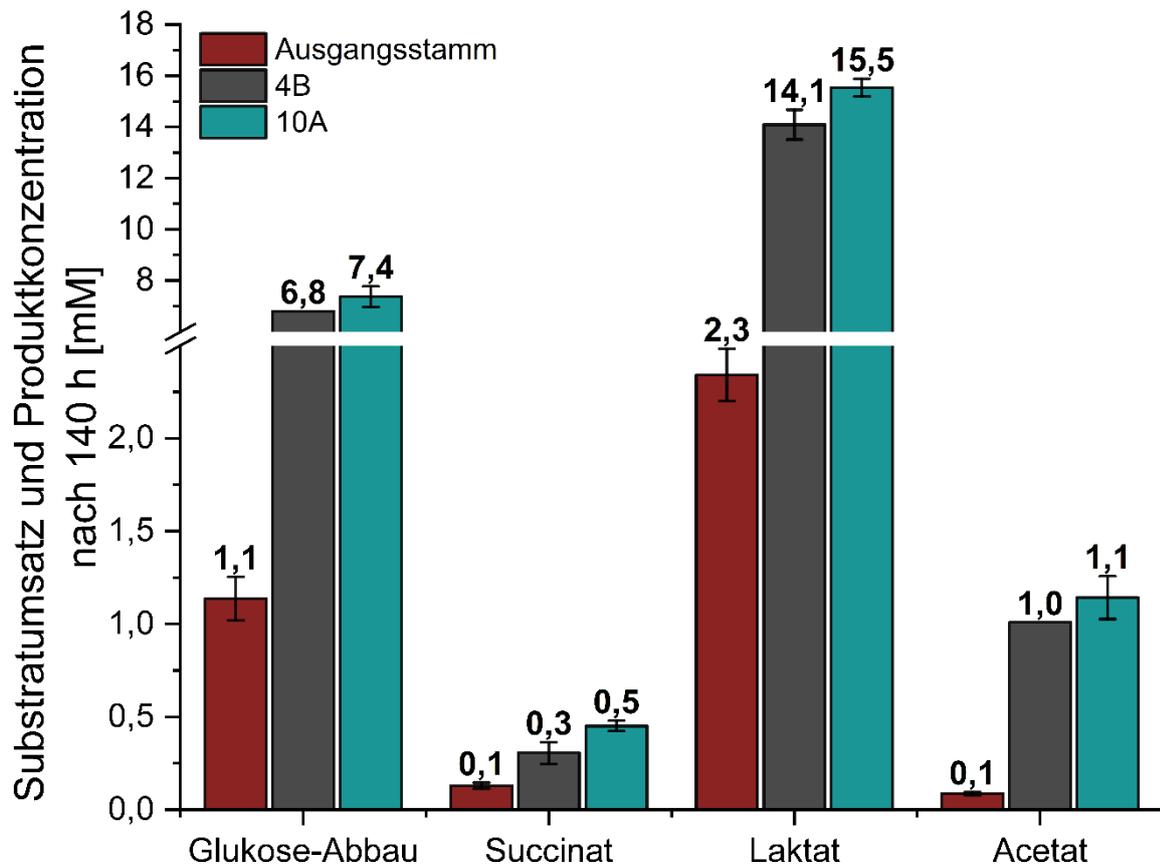
**Abbildung 24: Verlauf der Stromkurven von Klon 10A und 4B im Vergleich zum Ausgangsstamm in 140 h.** Während Klon 10A und Klon 4B bereits nach 24 h eine stabile Stromdichte erreichen, steigt die Stromdichte von Klon 4A kontinuierlich und erreicht erst nach etwa 110 h ein Plateau.

Die mittlere Stromdichte in 140 h ist in Abbildung 25 gezeigt. Beim Vergleich dieser Ergebnisse mit denen mit kürzerer Laufzeit wird deutlich, dass durch den eher linearen Anstieg der Stromdichte bei Klon 4B die längere Laufzeit einen erheblichen Einfluss auf die gemittelte Stromdichte hat. Die mittlere Stromdichte liegt bei Klon 4B nach 140 h bei  $112 \text{ mA/m}^2$ , während sie bei 86 h Laufzeit lediglich bei einer Stromdichte von  $66 \text{ mA/m}^2$  lag. Bei Klon 10A hat die längere Laufzeit kaum einen Einfluss auf die mittlere Stromdichte. Hier steigt der Wert lediglich von  $120 \text{ mA/m}^2$  auf  $130 \text{ mA/m}^2$  an. Auch beim Ausgangsstamm ist der Effekt sehr gering. Hier steigt die mittlere Stromdichte lediglich von  $15 \text{ mA/m}^2$  auf  $18,3 \text{ mA/m}^2$  an. Bei Betrachtung der Anzahl der Zellen auf der Anode zeigt sich, dass die Biofilmbildung bei beiden adaptierten Klonen deutlich gestiegen ist. So konnten bei Klon 4B 1,7-mal mehr Zellen auf der Anode gefunden werden als in den BES mit dem Ausgangsstamm, während bei Klon 10A 2,5-mal so viele Zellen auf der Anode zu finden waren (Abbildung 25).



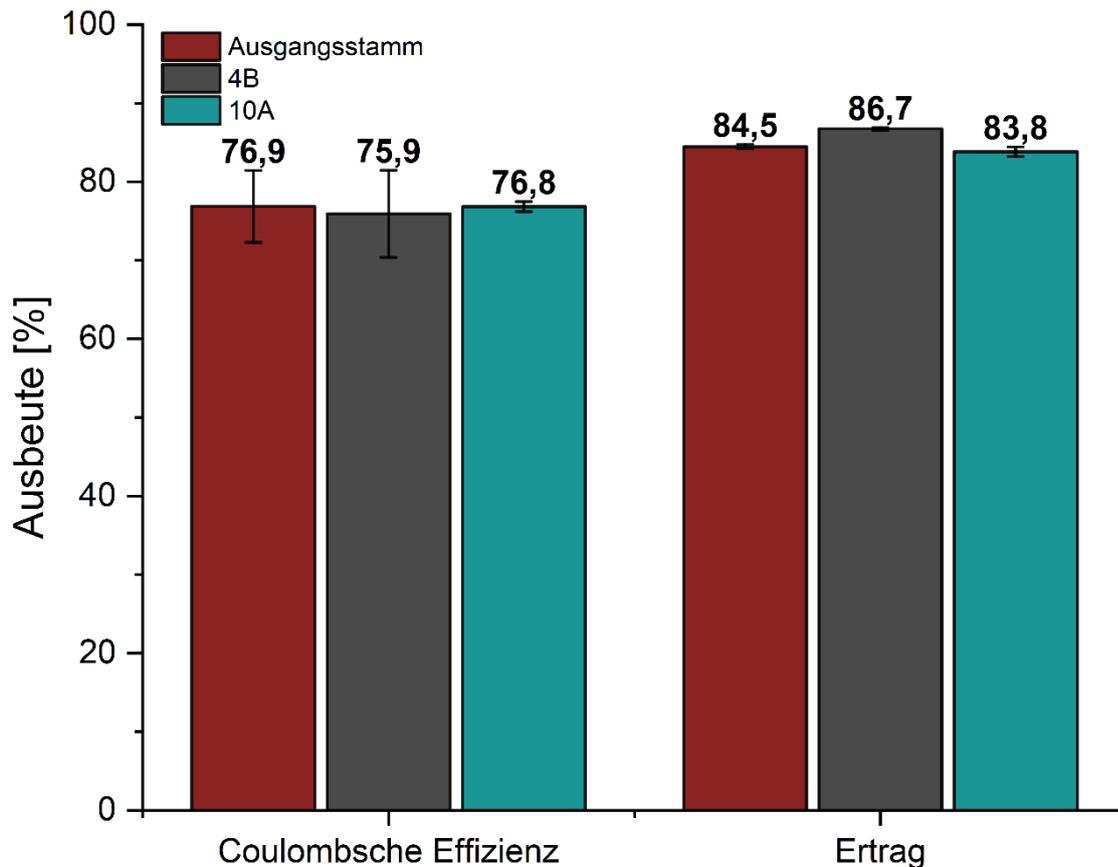
**Abbildung 25: Mittlere Stromdichte und Biofilmbildung der adaptierten Klone in 140 h im Vergleich zum Ausgangsstamm.** Die blau umrandeten Balken zeigen die mittlere Stromdichte in 140 h, während die grau schraffierten Balken die Zellzahl auf der Anode relativ zum Ausgangsstamm zeigen.

Zur weiteren Analyse der Einzelklone wurden der Substratumsatz sowie das Produktspektrum mittels HPLC bestimmt. Die Ergebnisse der Analyse sind in Abbildung 26 gezeigt. Während die Substratumsatzraten und auch die Produktkonzentrationen im Ausgangsstamm sehr gering sind, erreichen Klon 4B und Klon 10A um Faktor 6,2 bzw. 6,7 erhöhte Substratumsatzraten. Ebenso sind die Produktkonzentrationen deutlich erhöht. Als hauptsächliches Endprodukt wird in allen Klonen Laktat produziert. Pyruvat und Acetoin sind in keinem der untersuchten Klone detektierbar. Neben Laktat waren geringe Mengen Acetat und Succinat detektierbar.



**Abbildung 26: Substratumsatz und Produktkonzentrationen des Ausgangsstamms sowie der Klone 4B und 10A innerhalb von 140 h.** Während der Ausgangsstamm lediglich 1,1 mM Glukose umsetzt, setzen Klon 4B und 10A 6,8 mM bzw. 7,4 mM Glukose um. Auch die Konzentrationen der akkumulierten Produkte sind bei Klon 4B und Klon 10A deutlich höher als beim Ausgangsstamm. Das entstehende Hauptprodukt ist in allen Klonen Laktat.

Neben dem Substratumsatz und dem Endproduktspektrum wurden auch die coulombsche Effizienz und der Ertrag bestimmt. Dazu wurde wie in III.2.2. (siehe. III.2.2. Einfluss des Anodenpotentials auf das Endproduktspektrum) beschrieben vorgegangen. Die Ergebnisse der Berechnung sind in Abbildung 27 gezeigt. Bei allen untersuchten Klonen liegt die coulombsche Effizienz zwischen 75 % und 77 %. Es werden also 75 – 77 % der anfallenden Elektronen auf die Anode übertragen. Die Umwandlungseffizienz von Glukose in die Endprodukte liegt zwischen 83 % und 87 %. Das bedeutet, dass 83 – 87 % der abgebauten Glukose in den Endprodukten wiederzufinden ist.



**Abbildung 27: Coulombsche Effizienz und Ertrag des Ausgangsstamms sowie der Klone 4B und 10A.** Bei allen untersuchten Klonen liegt die coulombsche Effizienz zwischen 75 % und 77 %. Es werden also dreiviertel der anfallenden Elektronen auf die Anode übertragen. Die Umwandlungseffizienz von Glukose in die Endprodukte liegt zwischen 83 % und 87 %. Das bedeutet, dass 83 – 87 % der verstoffwechselten Glukose in den Endprodukten wiederzufinden ist.

Um zu untersuchen, welche genomischen Veränderungen den adaptierten Phänotypen zugrunde liegen, wurde das Genom der Klone 4B und 10A resequenziert und mit dem Genom des Ausgangsstamms verglichen.

### 2.5. Genom-Resequenzierung

Die Illumina-Sequenzierung wurde bei IMG M Laboratories GmbH (Planegg, Deutschland) auf einer MiSeq Plattform mit einer Sequenzierlänge von 2 x 150 bp (PE150) durchgeführt. Sequenziert wurden der Ausgangsstamm (Stamm-Nr. 1729) sowie die Klone 4B (Stamm-Nr. 1730) und 10A (Stamm-Nr. 1732). Die Sequenzierungen lieferten insgesamt 8.580.396 (Ausgangsstamm), 9.103.498 (4B) und 7.320.064 (10A) *reads* mit einer Durchschnittslänge von 133 – 135 bp. Diese wurden prozessiert und anschließend mit Hilfe einer *fixed ploidy variant detection* mit dem Ausgangsstamm und dem zugehörigen pBAD<sub>Pstc</sub>*alsSD*-Plasmid

## Ergebnisse

abgeglichen (siehe II.4.10.2. Auswertung der Genom-Resequenzierungen). Insgesamt konnten bei Klon 4B 8 Veränderungen und bei Klon 10A 7 Veränderungen im Genom ermittelt werden. Diese waren entweder Deletionen oder Basenvariationen. Im Fall von Basenvariationen kam es lediglich zum Austausch einzelner Basen, sogenannter *single nucleotide variants* (SNVs). In der weiteren Analyse wurden lediglich Basenaustausch-Mutationen betrachtet, die zu einer Veränderung der Aminosäure-Sequenz führten oder in Promotorbereichen zu finden waren.

Die entstandenen Veränderungen sind in Tabelle 30 aufgeführt. Dabei ist in codierenden Bereichen die aus dem Basenaustausch resultierende Veränderung der Aminosäure-Sequenz aufgeführt, während in Promotorbereichen der Basenaustausch aufgeführt ist. Die angegebenen Funktionen stammen aus den UniProt und KEGG Datenbanken (The UniProt Consortium, 2021; Kanehisa und Goto, 2000).

**Tabelle 30: Durch die Langzeitadaptation entstandene Veränderungen im Genom des Ausgangsstamms und im zugehörigen pBAD<sub>Pstc</sub>alsSD-Plasmid.**

Gen/Region	Mutation	Vorkommen [%]	Funktion	Klon
Promotorbereich von <i>SO_2650</i>	G153 → A	100	nicht charakterisiertes Protein	4B
<i>alsS</i>	Asp103 → Gly	100	Acetolaktat-Synthase	4B
<i>galP</i>	Val325 → Ala	99,97	Glukose-Importer	4B
<i>pilU</i>	Leu228 fs	98	ATPase zur Pilus-Retraktion	4B
<i>pilU</i>	Ala233 → Thr	55	ATPase zur Pilus-Retraktion	4B
Promotorbereich von <i>SO_4594</i>	G48 → T	50,84	nicht charakterisiertes Protein	4B
<i>cusA</i>	Phe544 → Ile	50,4	Kupfer/Silber-Efflux-Pumpe	4B
<i>SO_1003</i>	Gly104 → Ala	50,2	nicht charakterisiertes Protein	4B
<i>SO_0569</i>	Val140 fs	100	Zell Adhäsion	10A
<i>pyrC</i>	Pro44 → Arg	100	Pyrimidin-Biosynthese	10A
<i>SO_4366</i>	Ala13 → Thr	100	nicht charakterisiertes Protein	10A
<i>uvrY</i>	Gly 97 fs	91,6	Signal Transduktion	10A
<i>cusA</i>	Leu455 → Met	50,4	Kupfer/Silber-Efflux-Pumpe	10A
<i>frmA</i>	Gln337 → His	50,4	Oxidoreduktase	10A
<i>SO_4013</i>	Ala493 → Asp	50,3	nicht charakterisiertes Protein	10A

## Ergebnisse

Unter den in den adaptierten Klonen veränderten Genen befinden sich 3, welche eine Basendeletion und damit einen *frameshift* aufwiesen. Dies führt für gewöhnlich zu nicht funktionalen Proteinen (Streisinger *et al.*, 1966). Unter den Genen mit Basendeletion fanden sich *pilU*, *SO\_0569* und *SO\_4366*. In den anderen Genen und Promotorbereichen konnte der Austausch einzelner Basen festgestellt werden, welcher zu einer Veränderung der Aminosäure-Sequenz führt.

Vier der veränderten Gene können in Zusammenhang mit differentieller Biofilmbildung gebracht werden. So konnten Deutschbauer und Kolleg:innen bei einer Transposon-Mutation in *SO\_2650* eine verringerte Biofilmbildung auf Soft-Agar beobachten (Deutschbauer *et al.*, 2011). Des Weiteren resultiert eine Deletion der ATPase zur Pilus-Retraktion *pilU* in einer gesteigerten elektrischen Leistung in MFCs (*microbial fuel cells*) durch erhöhte Biofilmbildung (Tajima *et al.*, 2011). Auch Diguanylat-Zyklasen, wie *SO\_0569*, beeinflussen die Biofilmbildung durch Erhöhung des zyklischen di-GMP-Spiegels für gewöhnlich maßgeblich (Matsumoto *et al.*, 2021, Gambari *et al.*, 2018). Zuletzt wurde auch *uvrY* bereits im Zusammenhang differentieller Biofilmbildung beschrieben (Müller *et al.*, 2013). Die Zusammenhänge der Biofilmregulation der adaptierten Klone und die Schlussfolgerungen, welche aus den generierten Daten gezogen werden können werden in Abschnitt IV.2.4. diskutiert (siehe IV.2.4. Genomische Anpassungen der adaptierten Einzelklone).

## IV. Diskussion

Der erste Teil der hier vorgestellten Arbeit behandelt die Riboflavin-induzierte Biofilmbildung von *S. oneidensis*. Dabei war von besonderem Interesse, einen Einblick in die zugrunde liegenden Mechanismen zu erlangen sowie die Relevanz der Riboflavin-induzierten Biofilmbildung unter nativen Bedingungen zu beurteilen. Der Fokus des zweiten Teils dieser Arbeit lag auf der Erweiterung des Substrat- und Produktspektrums von *S. oneidensis* einhergehend mit der Optimierung der Umsatzraten. Dazu konnte eine Strategie zur Langzeitadaptation in einem BES entwickelt werden, die in Hinblick auf die genomischen Anpassungen des Produktionsstammes diskutiert wird.

### 1. Riboflavin als *Quorum sensing*-Molekül

Die Tatsache, dass die Zugabe von geringen Mengen Riboflavin die Biofilmbildung von *S. oneidensis* steigern kann, wurde sowohl von Bao und Kolleg:innen als auch Arinda und Kolleg:innen beobachtet (Bao *et al.*, 2016; Arinda *et al.*, 2019). Dieser Phänotyp kann durch unterschiedliche Funktionen von Riboflavin begünstigt werden. Zum einen ist denkbar, dass der gesamte entstehende Biofilm durch die erhöhte Riboflavin-Konzentration leitfähiger wird. Als Folge der erhöhten Leitfähigkeit können auch weiter von der Anode entfernte Zellen die Elektronen übertragen. Der Biofilm kann also in größerem Abstand zur Anode wachsen. Allerdings ist die Riboflavin-Produktion für Mikroorganismen mit einem nicht unerheblichen ATP-Verbrauch verbunden. So benötigt eine *S. oneidensis*-Zelle für die Produktion eines Mols Riboflavin bis zu 25 Mol ATP (Bacher *et al.*, 2000; Dauner *et al.*, 2002). Bei Betrachtung der Gesamt-Energieausbeute von *S. oneidensis* in BES betragen die Kosten für die Produktion von beobachteten Riboflavin-Konzentrationen laut Marsili und Kolleg:innen lediglich <0,1 % des Gesamt-ATPs, das der Zelle zur Verfügung steht (Marsili *et al.*, 2008). Allerdings lässt diese Betrachtung außen vor, dass *S. oneidensis* unter natürlichen Bedingungen in großen Gewässern heimisch ist. Das bedeutet, dass sekretiertes Riboflavin stärker verdünnt wird und deutlich größere Riboflavin-Mengen für vergleichbare Effekte produziert werden müssten. Dadurch nimmt das *metabolic burden* durch die Riboflavin-Produktion zu. So hat der Oneida See in New York ein Volumen von etwa  $1,38 \times 10^{14}$  l, was  $1,38 \times 10^{16}$  mal mehr ist als das Volumen in den Versuchen von Marsili und Kolleg:innen. Dies macht deutlich, dass wesentlich mehr des zur Verfügung stehenden ATPs von den Mikroorganismen investiert werden müsste, um einen effizienten Elektronentransfer durch Riboflavin zu gewährleisten. Nach Betrachtung dieses Hintergrunds erschien es zunehmend unwahrscheinlich, dass sich ein solch energieaufwändiger Elektronentransfermechanismus evolutionär durchsetzt. Daher wurde in dieser Arbeit eine

weitere mögliche Funktion von Riboflavin untersucht. Es ist möglich, dass Riboflavin die Biofilmbildung direkt beeinflusst, indem es die Funktion eines *Quorum sensing*-Moleküls einnimmt. Hier würde die gesteigerte Riboflavin-Konzentration direkt die Genexpression der Zellen beeinflussen und dadurch eine erhöhte Biofilmbildung ermöglichen. Diese Hypothese wurde in dieser Arbeit genauer untersucht und durch die vorliegenden Ergebnisse gestützt.

### **1.1. Einfluss von Riboflavin auf die Genexpression**

Um den Einfluss von Riboflavin auf die Genexpression in *S. oneidensis* zu untersuchen, wurde zunächst ein vergleichendes Transkriptom mit und ohne Zugabe von 37 nM Riboflavin erstellt. Neben der biofilminduzierenden Wirkung ist Riboflavin auch in der Lage, als Elektronenshuttle zu fungieren (Marsili *et al.*, 2008; Brutinel and Gralnick, 2012; Okamoto *et al.*, 2013). Um die Analyse unabhängig von der Elektronenshuttle-Funktion von Riboflavin zu gestalten, wurde ein löslicher Elektronenakzeptor gewählt, in diesem Fall Fumarat. Insgesamt waren nur vier Gene durch die Riboflavin-Zugabe signifikant reguliert. Darunter war das Gen für die Ornithin-Decarboxylase *speC* als einziges Gen signifikant mit einem Faktor von 2,04 überexprimiert. Neben *speC* waren die Gene für die Sortase *srtA* sowie die Gene für den Methylcitrat-responsiven Regulator *prpR* und für die 2-Methylisocitrat-Lyase *prpB* reprimiert.

Die Ornithin-Decarboxylase SpeC katalysiert die Umwandlung von Ornithin zu Putrescin und spielt damit eine entscheidende Rolle in der Polyamin-Synthese. Es ist bereits bekannt, dass Polyamine in zahlreichen Humanpathogenen die Biofilmbildung maßgeblich beeinflussen. So zeigte *Yersina pestis* eine verringerte Biofilmbildung durch Mutationen in *speA* oder *speC*. Eine Deletion beider Gene ergab einen Phänotyp, der außerstande war, messbaren Biofilm zu bilden (Patel *et al.*, 2006). Auch in *Vibrio cholerae* spielen Polyamine eine entscheidende Rolle bei der Biofilmbildung. Karatan und Kolleg:innen konnten nachweisen, dass der Mikroorganismus auf veränderte Norspermidin-Konzentrationen mit differentieller Biofilmbildung reagiert (Karatan *et al.*, 2005). Von dieser Datenlage ausgehend ist die Ornithin-Decarboxylase SpeC ein vielversprechender Kandidat für das Schlüsselement der Riboflavin-induzierten Biofilmbildung.

Neben *speC* war auch das Gen für die Sortase *srtA* durch die Zugabe von Riboflavin differentiell reguliert. Im Gegensatz zu *speC* war *srtA* um den Faktor 2,04 reprimiert. In Gram-positiven Mikroorganismen werden Sortasen genutzt, um Proteine auf der Zelloberfläche zu lokalisieren (Scott and Barnett, 2006). Hierbei fungieren Sortasen als Cystein-Transpeptidasen, welche Proteine mit entsprechender Signalsequenz verknüpfen (Marraffini *et al.*, 2006; Clancy *et al.*, 2010). Durch ihre Funktion haben Sortasen einen großen Einfluss auf die Beschaffenheit

der Zelloberfläche und können damit einen entscheidenden Einfluss auf die bakterielle Adhäsion und dadurch auf die Biofilmbildung haben. Sowohl Pallen und Kolleg:innen als auch Clubb und Comfort konnten Sortasen ebenfalls im Genom Gram-negativer Mikroorganismen identifizieren. Allerdings konnte die genaue Funktion von Sortasen in Gram-negativen Mikroorganismen bisher nicht aufgeklärt werden (Pallen *et al.*, 2001; Comfort and Clubb, 2004). Ausgehend von der Funktion in Gram-positiven Mikroorganismen war eine genauere Betrachtung der Funktion von SrtA für die Riboflavin-induzierte Biofilmbildung dennoch von großem Interesse.

Neben *srtA* waren auch die Gene für den Methylcitrat-responsiven Regulator *prpR* und für die 2-Methylisocitrat Lyase *prpB* reprimiert. Die beiden korrespondierenden Enzyme erfüllen Schlüsselfunktionen im Propionat-Metabolismus. Dabei dient PrpR als Transkriptionsregulator und aktiviert den Propionat-Abbau, während PrpB mit der Umwandlung von 2-Methylisocitrat zu Succinat und Pyruvat eine entscheidende Rolle innerhalb des Propionat-Stoffwechsels spielt (Textor *et al.*, 1997; Tsang *et al.*, 1998). Beide Proteine sind bisher nicht im Zusammenhang mit Biofilmbildung gebracht worden.

### **1.2. Einfluss der durch Riboflavin regulierten Gene auf die Biofilmbildung und die Stromproduktion**

Um die Relevanz der signifikant differentiell exprimierten Gene und deren zugehöriger Proteine für die Riboflavin-induzierte Biofilmbildung zu untersuchen, wurden *S. oneidensis*-Stämme erstellt, in denen die jeweiligen Gene überexprimiert oder deletiert wurden. Dabei wurde für Gene, welche durch die Zugabe von Riboflavin höher exprimiert wurden, zunächst ein Überexpressionsstamm erstellt, während bei reprimierten Genen versucht wurde, Deletionsstämme zu erstellen. Die Deletion der Gene innerhalb des Propionat-Metabolismus war allerdings nicht möglich. Nach der homologen Rekombination war der einzig verbleibende Genotyp bei beiden Genen der WT. Dies deutet auf eine mögliche Letalität oder drastische Wachstumsnachteile durch die eingebrachten genomischen Veränderung hin. In Folge dessen konnte der Einfluss von *prpR* und *prpB* auf *S. oneidensis* in BES nicht weiter untersucht werden.

Im Fall von *speC* konnte das Gen auf das *multi-copy*-Plasmid pBAD kloniert und von dort überexprimiert werden. Die Überexpression von *speC* führte in BES zu einem vergleichbaren Phänotyp wie die Zugabe von 37 nM Riboflavin. Dies war sowohl in Hinblick auf die Stromdichte als auch auf die Zellzahl an der Anode der Fall. Das deutet darauf hin, dass *speC* für die Riboflavin-induzierte Biofilmbildung eine entscheidende Rolle spielt. Um dies zu

## Diskussion

verifizieren, wurden weitere Experimente durchgeführt. Zunächst wurde der Effekt einer Riboflavin-Zugabe zum Überexpressionsstamm analysiert. Allerdings konnte durch die Zugabe von 37 nM Riboflavin weder die Stromdichte noch die Biofilmbildung weiter gesteigert werden. Dies ist zunächst verwunderlich, da Riboflavin als Elektronenshuttle dient und damit den Elektronenübertrag von planktonischen Zellen auf die Anode steigert. Experimente zur Untersuchung von Flavinen als Elektronenshuttle wurden allerdings durch die Zugabe von Flavin-Konzentrationen im mikromolaren Bereich durchgeführt (Kotloski and Gralnick, 2013). Zur Produktion von 10  $\mu$ M Flavinen wird aber nach den Daten von Kotloski und Gralnick eine  $OD_{600}$  von etwa 6,5 über einen Zeitraum von 15 h benötigt, was unter natürlichen Bedingungen unwahrscheinlich ist. Möglicherweise wirken sich Konzentrationen im nanomolaren Bereich nicht signifikant auf die Elektronentransferrate von *S. oneidensis* in BES aus. Die zweite mögliche Funktion von Riboflavin, die Biofilminduktion und damit einhergehende Steigerung der Stromdichte, wird augenscheinlich im Fall des *speC*-Überexpressionsstamms durch die erhöhte Expression von *speC* übernommen. Diese Hypothese wird durch die Untersuchung des *speC*-Deletionsstamms gestützt. Die Deletion von *speC* hat zunächst keinen signifikanten Einfluss auf die Stromdichte oder die Biofilmbildung von *S. oneidensis* unter den untersuchten Bedingungen. Bei Zugabe von 37 nM Riboflavin zum Deletionsstamm tritt allerdings nicht der beim WT beobachtete Effekt der gesteigerten Stromdichte und Biofilmbildung auf. Stattdessen erreicht der Stamm ähnliche Stromdichten, wie der WT oder der *speC*-Deletionsstamm. Dies lässt darauf schließen, dass der Mechanismus der Riboflavin-induzierten Biofilmbildung *speC* als zentrales Regulationselement benutzt. Riboflavin scheint die Expression von *speC* zu erhöhen, was in Folge sowohl die Biofilmbildung, als auch die Stromdichte steigert. Die Mechanismen der *speC*-induzierten Biofilmbildung wurden daher im Folgenden genauer untersucht.

Neben der Ornithin-Decarboxylase *speC* wurde auch der Einfluss der Sortase *srtA* auf die Stromdichte von *S. oneidensis* in BES untersucht. Da die Sortase durch die Zugabe von 37 nM Riboflavin reprimiert wurde, wurde ein *srtA*-Deletionsstamm erstellt und in BES untersucht. Die Deletion von *srtA* hatte allerdings keinerlei Auswirkungen auf die Stromdichte in BES. Das lässt darauf schließen, dass die reprimierte *srtA*-Expression ein Nebeneffekt der erhöhten Riboflavin-Konzentration ist und nicht im Zusammenhang mit dem in dieser Arbeit untersuchten Phänotyp steht.

### 1.3. Einfluss verschiedener Riboflavin-Konzentrationen auf die Expression von *speC*

Um zu untersuchen, ab welcher Riboflavin-Konzentration die Expression der Ornithin-Decarboxylase *speC* induziert wird, wurden verschiedene Riboflavin-Konzentrationen zu *S. oneidensis* WT-Zellen zugegeben. Nach 5 h anoxischem Wachstum wurde die Expression von *speC* mittels qPCR untersucht. In der Studie von Arinda und Kolleg:innen wurde das Biofilmwachstum durch die Zugabe von 37 nM Riboflavin erhöht (Arinda *et al.*, 2019). Um zu untersuchen, ob eine niedrigere Konzentration bereits zu dem beobachteten Effekt führt und ob dieser durch eine höhere Riboflavin-Konzentration verstärkt wird, wurden Konzentrationen im Bereich von 5 nM – 100 nM Riboflavin zugegeben. Die Expression wurde ab einer Zugabe von 15 nM Riboflavin leicht erhöht. Allerdings war die Erhöhung der *speC*-Expression erst ab einer Riboflavin-Konzentration von 18,5 nM signifikant. Durch die Zugabe von höheren Riboflavin-Konzentrationen wurde die *speC*-Expression nicht mehr signifikant gesteigert. Da die *speC*-Expression durch die Zugabe von Riboflavin insgesamt lediglich verdoppelt wird, ist durch den gewählten Versuchsansatz nicht eindeutig feststellbar, ob die Induktion von *speC* durch Riboflavin graduell gesteigert wird oder sich ab einem bestimmten Schwellenwert verdoppelt. Um dies festzustellen, wäre ein sensitiverer Versuchsaufbau nötig. Ein Ansatz, um die Expression von *speC* genauer zu untersuchen, wäre ein Reportergen-Assay. Hierbei würde der native Promotor vor ein Reportergen, wie zum Beispiel FAST (*fluorescence-activating and absorption-shifting Tag*), kloniert und die Aktivität des Reportergens unter Zugabe verschiedener Riboflavin-Konzentrationen quantifiziert (Henry *et al.*, 2018). Durch die in dieser Arbeit gewählte Methode konnte eindeutig festgestellt werden, dass die Induktion von *speC* bereits bei einer Riboflavin-Konzentration von 18,5 nM erfolgt und durch erhöhte Riboflavin-Konzentrationen nicht weiter gesteigert wird.

Riboflavin kann nur die Rolle eines *Quorum sensing*-Moleküls einnehmen, wenn die für die Genexpression benötigten Konzentrationen auch von den Mikroorganismen selbst unter nativen Bedingungen synthetisiert werden. Daher wurde untersucht, welche Riboflavin-Konzentrationen von *S. oneidensis* in einer Batch-Kultur erreicht werden und wie sich diese auf die *speC*-Expression auswirken. Beim Wachstum in M4-Medium und einer Start-OD<sub>600</sub> von 0,2 wurde nach 600 min eine Riboflavin-Konzentration von 39 nM erreicht. Diese Konzentration führte zu einem Anstieg der *speC*-Expression um den Faktor 2,02. Der Zeitpunkt nach 600 min war der einzige Zeitpunkt, welcher eine signifikante Steigerung der *speC*-Expression zeigte. Diese Riboflavin-Konzentrationen sind innerhalb derselben Größenordnung von publizierten durch *S. oneidensis* sekretierten Riboflavin-Konzentrationen. In einer von Covington und Kolleg:innen vorgelegten Studie wurden innerhalb von 24 h Riboflavin-

Konzentrationen von 110 nM sekretiert (Covington *et al.*, 2010). Marsili und Kolleg:innen quantifizierten innerhalb von 96 h Riboflavin-Konzentrationen zwischen 250 und 500 nM (Marsili *et al.*, 2008). In Anbetracht der deutlich kürzeren Inkubationszeit der hier vorgestellten Experimente, erscheinen die sekretierten Konzentrationen realistisch.

Konzentrationen unter 39 nM haben in dem hier durchgeführten Experiment keinen Einfluss auf die *speC*-Expression. Dies scheint zunächst dem vorherigen Experiment, in welchem eine *speC* Induktion ab einer Riboflavin-Zugabe von 18,5 nM erfolgte, zu widersprechen. Allerdings wurde im ersten Fall lediglich die extern zugegebene Riboflavin-Konzentration betrachtet, während im zweiten Experiment die nativ produzierten Riboflavin-Konzentrationen untersucht wurden.

Ausgehend von der Studie von Covington und Kolleg:innen, ist es möglich, eine Riboflavin-Produktionsrate zu berechnen. Laut Covington und Kolleg:innen werden innerhalb von 24 h 0,11  $\mu\text{M}$  Riboflavin durch eine  $\text{OD}_{600}$  von 0,07 produziert (Covington *et al.*, 2010). Dies entspricht etwa einer Produktionsrate von 0,0229  $\mu\text{M}$  Riboflavin in 5 h bei einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,07. Insgesamt ist also davon auszugehen, dass die Induktion von *speC* durch 22,9 nM von *S. oneidensis* synthetisiertes Riboflavin zusammen mit 18,5 nM zugegebenem Riboflavin erfolgt. Daraus ergibt sich eine Gesamt-Konzentration von 41,4 nM Riboflavin, was vergleichbar ist mit den 39 nM sekretiertes Riboflavin, welches im zweiten Versuch zu einer natürlichen Induktion von *speC* führte.

### **1.4. Funktionsweise der Biofilmbildung durch Riboflavin**

#### **1.4.1. Externe Putrescin Zugabe**

Die vorangehenden Experimente zeigen deutlich, dass die Riboflavin-induzierte Biofilmbildung durch die erhöhte Expression der Ornithin-Decarboxylase SpeC induziert wird. Daraufhin stellte sich die Frage, wie genau die Induktion von *speC* die Biofilmbildung beeinflusst. Von *Yersina pestis* ist bereits bekannt, dass Deletionen von *speA* oder *speC* eine verringerte Biofilmbildung des Mikroorganismus zur Folge haben. Des Weiteren inhibiert die Deletion beider Gene die Biofilmbildung gänzlich. Durch die Zugabe von Putrescin konnte die Biofilmbildung des Doppel-Deletionsstamms wieder nahezu auf das Niveau des WT gesteigert werden (Patel *et al.*, 2006). Auch Shi und Kolleg:innen konnten einen Zusammenhang zwischen exogener Putrescin-Zugabe und gesteigerter Biofilmbildung herstellen. In *Dickeya zeeae* hat die Deletion von *speA* eine verringerte Motilität und Biofilmbildung zur Folge. Dieser Effekt konnte ähnlich wie bei *Yersina pestis* durch die Zugabe von Putrescin-

Konzentrationen von 0,01 – 1 mM aufgehoben werden (Shi *et al.*, 2019). Um zu untersuchen, ob die exogene Zugabe von Putrescin zu *S. oneidensis* in BES einen ähnlichen Effekt auf die Biofilmbildung und Stromdichte hat wie die Überexpression von *speC*, wurden verschiedene Putrescin-Konzentrationen zu *S. oneidensis* in BES gegeben. Dabei wurde zunächst der Effekt von 1 mM Putrescin untersucht, da diese Konzentration auch in den Arbeiten von Shi und Kolleg:innen und Patel und Kolleg:innen einen deutlichen Effekt zeigte. Allerdings sank sowohl die Stromdichte als auch die Biofilmbildung durch die Zugabe von 1 mM Putrescin zu *S. oneidensis* WT in BES signifikant. Diese Beobachtung deutet auf einen toxischen Effekt von hohen Putrescin-Konzentrationen hin. Von Borselli und Kolleg:innen wurde bereits ein antimikrobieller Effekt von Polyaminen beobachtet. Dieser Effekt beruht vermutlich auf der Depolarisierung und Permeabilisierung der äußeren Membran (Borselli *et al.*, 2017). Bei der von Borselli und Kolleg:innen durchgeführten Studie trat der antimikrobielle Effekt durch die Zugabe von Squalamin oder MOTU N44 ab einer Konzentration von 2,6  $\mu\text{M}$  auf. Dieser Effekt wird mit zunehmender Polyamin-Konzentration verstärkt. Ein ähnlicher Effekt wäre auch bei den hier durchgeführten *S. oneidensis*-Experimenten denkbar. Bei der Zugabe von niedrigeren Putrescin-Konzentrationen zwischen 0,5 und 5  $\mu\text{M}$  zu BES mit *S. oneidensis* WT war kein signifikanter Effekt feststellbar. Dies kann entweder daran liegen, dass die gewählten Konzentrationen nicht ausreichen, um einen signifikanten Effekt durch Putrescin auszulösen, oder die im *S. oneidensis*-Genom kodierten Putrescin-Importer sind nicht funktional. In *S. oneidensis* sind zwar Transporter für den Import von Putrescin kodiert (*SO\_1270*, *SO1271*, *SO\_1272*, *SO\_1273\_SO\_0313*), allerdings gibt es bisher keine Studien zu deren Expression oder Funktionalität. Da die Funktion von Putrescin als Biofilm-Induktor hauptsächlich von humanpathogenen Mikroorganismen genutzt wird, ist es denkbar, dass die zur Putrescin-Aufnahme benötigten Gene in *S. oneidensis* nicht exprimiert werden.

### 1.4.2. Proteom-Analyse

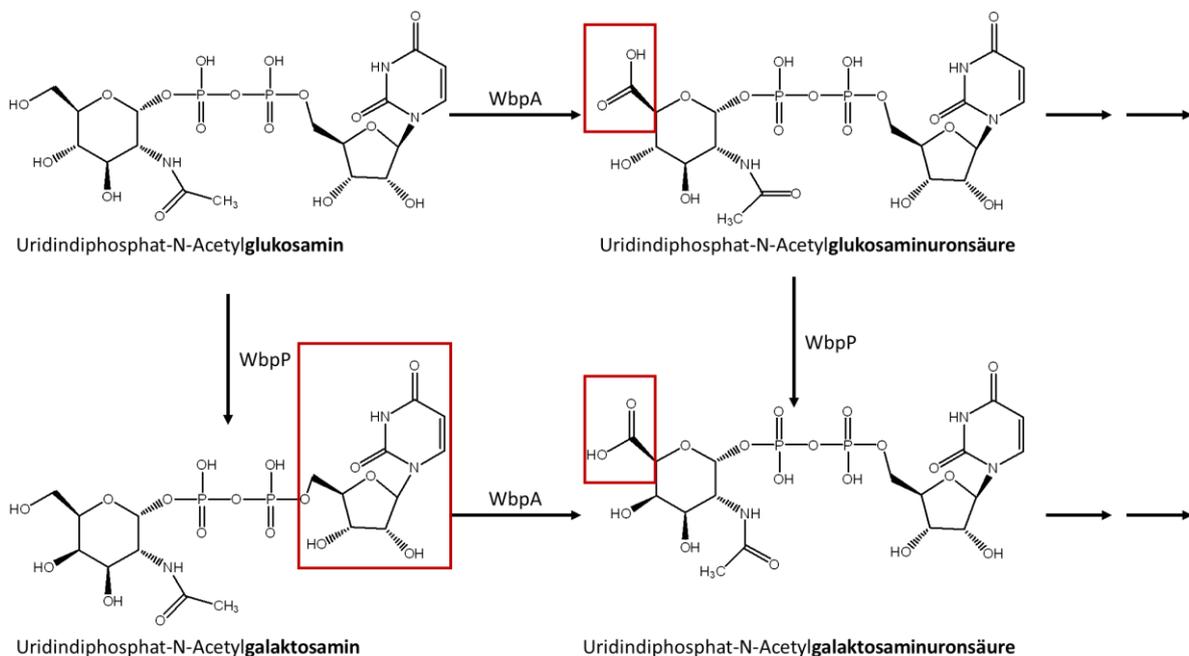
Da die Zugabe von Putrescin in keiner der gewählten Konzentrationen zu einem positiven Effekt auf die Stromdichte oder die Biofilmbildung von *S. oneidensis* in BES führte, sollte im Anschluss untersucht werden, ob die erhöhte Biofilmbildung durch eine Protein-Protein-Interaktion zustande kam. Dazu wurde ein vergleichendes Proteom von *S. oneidensis* WT sowie des *speC*-Überexpressionsstamms erstellt. Die Proteom-Analyse resultierte in 37 signifikant regulierten Proteinen durch die Überexpression von *speC*. Unter den signifikant regulierten Proteinen waren einige der Aminosäuresynthese. Dies scheint naheliegend, da *speC* eine wichtige Rolle im Arginin- und Prolin-Metabolismus spielt. Unter anderem werden die Acetylglutamat-Kinase ArgB und die Putrescin-Synthase PuaA überexprimiert, während die

Putrescin Amidase AguB reprimiert wird. Es ist denkbar, dass *S. oneidensis* durch die Expression und Repression der jeweiligen Gene versucht, die stark erhöhte Putrescin-Produktion durch die Überexpression von *speC* auszugleichen. Dies entspricht auch der Annahme, dass zu hohe Polyamin-Konzentrationen einen antimikrobiellen Effekt hervorrufen. Neben Proteinen der Aminosäuresynthese sind auch einige Proteine, welche einen Einfluss auf die Biofilmbildung haben können, signifikant reguliert. So ist zum Beispiel die Glukose-1-Phosphat-Thymidyltransferase RmlA mit einem  $\log_2$  *fold change* von 1,09 hochreguliert. RmlA katalysiert die Synthese von dTDP- $\alpha$ -D-Glukose, einer Vorstufe von Lipopolysacchariden und EPS. In *Stenotrophomonas maltophilia* WR-CX führt eine Mutation in *rmlA* zu einer verschlechterten Biofilmbildung auf Polystyrol, während die Biofilmbildung auf Glas verbessert wird (Huang *et al.*, 2006). Neben RmlA ist auch die Expression der Deoxycytidin-Triphosphat-Deaminase DctP erhöht. Diese katalysiert die Desaminierung von Deoxycytidin-Triphosphat zu Deoxyuridin-Triphosphat. Dieser Prozess steht bisher kaum in einer Verbindung zu Biofilmbildung. Allerdings konnten Vera und Kolleg:innen bereits beobachten, dass die Deoxycytidine-Triphosphat-Deaminase in frühen Stadien der Biofilmbildung von *Acidithiobacillus ferrooxidans* überexprimiert wird (Vera *et al.*, 2013). Auch die Überexpression von ProQ, einem RNA-Chaperon, lässt Rückschlüsse auf eine differentielle Biofilmbildung zu. So wirkt sich ProQ in *E. coli* positiv auf die Biofilmbildung aus. Dabei fungiert ProQ als regulatorisches Translations-Element (Sheidy and Zielke, 2013). Ein Einfluss auf die Biofilmbildung ist auch durch die Überexpression der Uridindiphosphat-N-Acetylglukosamin-C4-Epimerase WbpP bekannt. Diese Epimerase katalysiert die Umwandlung von Uridindiphosphat-N-Acetylglukosamin zu Uridindiphosphat-N-Acetylgalaktosamin, einem wichtigen Bestandteil der Polysaccharid-Synthese. Aus *Vibrio vulnificus* und *Thermus spp.* ist bereits bekannt, dass eine Überexpression von WbpP zu einer vermehrten Kapsel- und Biofilmbildung führt (Niou *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2013). Unter den reprimierten Proteinen sind ebenso einige zu finden, welche in Verbindung mit dem beobachteten Biofilm-bildenden Phänotyp stehen könnten. Darunter findet sich SO\_1208, ein Protein mit einer GGDEF-Domäne. Die genaue Funktion dieses Proteins ist noch weitgehend unklar, allerdings spielen Proteine mit einer GGDEF-Domäne häufig eine entscheidende Rolle bei der Regulation des intrazellulären zyklischen di-GMP-Spiegels (Krasteva *et al.*, 2012). Der intrazelluläre zyklische di-GMP-Spiegel ist wiederum ein Regulator für die Biofilmbildung (Cotter and Stibitz, 2007).

Da WbpP anhand der bestehenden Literatur als besonders vielversprechendes Protein für eine positive Biofilmregulation in *S. oneidensis* identifiziert wurde, wurde der Einfluss einer Überexpression von *wbpP* auf die Stromproduktion und die Biofilmbildung von *S. oneidensis*

## Diskussion

in BES untersucht. Allerdings sank durch die Überexpression von *wbpP* sowohl die Stromdichte als auch die Biofilmbildung von *S. oneidensis*. *WbpP* formt im *S. oneidensis*-Genom ein Cluster mit der Uridindiphosphat-N-Acetyl-D-Glukosamin-Dehydrogenase *wbpA*. Diese war im Proteom auch leicht überexprimiert, allerdings war die Überexpression von *wbpA* nicht signifikant. Dennoch wird bei genauerer Betrachtung klar, dass die Funktionen der Proteine miteinander zusammenhängen. Während *WbpP* die Umsetzung von Uridindiphosphat-N-Acetylglukosamin zu Uridindiphosphat-N-Acetylgalaktosamin katalysiert, ist *WbpA* in der Lage, Uridindiphosphat-N-Acetylglukosamin oder Uridindiphosphat-N-Acetylgalaktosamin zu den entsprechenden Uronsäuren umzuwandeln (siehe Abbildung 28). Beide Enzyme konkurrieren also um dasselbe Substrat. Daher ist es wahrscheinlich, dass *WbpA* für die Feinabstimmung der Polysaccharid-Synthese durch *WbpP* essentiell ist.



**Abbildung 28: Umwandlung von Uridindiphosphat-N-Acetylglukosamin durch *WbpP* und *WbpA*.** Uridinphosphat-N-Acetylglukosamin kann entweder durch *WbpP* zu Uridinphosphat-N-Acetylgalaktosamin oder durch *WbpA* zu Uridinphosphat-N-Acetylglukosaminsäure umgewandelt werden. Aus den beiden Produkten kann im Anschluss entweder durch *WbpP* oder durch *WbpA* Uridinphosphat-N-Acetylgalaktosaminuronsäure synthetisiert werden. Aus Uridindiphosphat-N-Acetylglukosaminuronsäure und aus Uridinphosphat-N-Acetylgalaktosaminuronsäure werden im Anschluss die entsprechenden Amide gebildet.

Um diese These zu überprüfen, wurden die Gene für beide Proteine überexprimiert und die Wirkung auf die Stromdichte und Biofilmbildung von *S. oneidensis* in BES untersucht. Durch die Überexpression von *wbpP* und *wbpA* zusammen konnte die Stromdichte von *S. oneidensis* um 44,5 % erhöht werden. Ebenso stieg die Anzahl der Zellen auf der Anode um 97 %. Dieser Effekt ist zwar geringer als der durch die Überexpression von *speC* beobachtete Effekt, es wird

allerdings dennoch deutlich, dass *wbpP* und *wbpA* die Biofilmbildung und die Stromdichte unter den gewählten Bedingungen signifikant beeinflussen.

### **1.5. Native Flavin-Produktion von *S. oneidensis* planktonisch und im Biofilm**

Um die Zusammensetzung der sekretierten Flavin-Spezies unter planktonischen Bedingungen zu analysieren, wurden *S. oneidensis* WT-Zellen in M4-Medium kultiviert. Während des Wachstums wurden stündlich Proben genommen und auf die Zusammensetzung der Flavin-Spezies untersucht. Nach etwa 6 h erreichte die Kultur die exponentielle Wachstumsphase. Dies spiegelt sich auch in den exponentiell steigenden FMN-Konzentrationen wieder. Erst nach 10 h sind geringe Mengen Riboflavin detektierbar. Insgesamt bleibt während des gesamten Wachstums die Riboflavin-Konzentration deutlich unter der FMN-Konzentration. Nach etwa 18 h ging *S. oneidensis* in die stationäre Wachstumsphase über und keine weiteren Flavine wurden produziert. Im Gegensatz zur Flavin-Produktion unter planktonischen Bedingungen zeigt sich im Biofilm eine vermehrte Produktion von Riboflavin. Nachdem innerhalb der ersten 72 h noch hauptsächlich FMN im Überstand des Biofilms detektiert werden konnte, ändert sich dieser Trend und nach 97 h konnte hauptsächlich Riboflavin detektiert werden. Im Verlauf des Biofilm-Wachstums steigt das Verhältnis von sekretiertem Riboflavin zu sekretiertem FMN. Nach 143 h wird 17-mal mehr Riboflavin als FMN sekretiert. Dieses Verhältnis setzt sich auch innerhalb des Biofilms fort.

Nach von Canstein und Kolleg:innen sowie Marsili und Kolleg:innen ergeben sich ähnliche Flavin-Verhältnisse. Während von Canstein und Kolleg:innen die Flavin-Produktion von planktonischen *S. oneidensis*-Zellen untersuchten, lag bei Marsili und Kolleg:innen der Schwerpunkt auf *S. oneidensis*-Biofilmen in BES. Erstere beobachteten ebenso einen starken Anstieg von FMN in frühen Wachstumsphasen und eine Bildung geringerer Riboflavin-Konzentrationen während des exponentiellen Wachstums. FAD scheint erst durch Zellyse in den Überstand abgegeben zu werden. Dabei wird etwa 2,75-mal mehr FMN als Riboflavin freigesetzt. In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde etwa 2,5-mal mehr FMN als Riboflavin freigesetzt. Den Flavin-Konzentrationen des planktonischen Wachstums stehen die Konzentrationen des Wachstums im Biofilm gegenüber. Hier verschiebt sich das Verhältnis deutlich zugunsten von Riboflavin. Ein ähnlicher Wechsel von FMN zu Riboflavin als Haupt-Flavin-Spezies konnte auch durch Marsili und Kolleg:innen beobachtet werden. Hier war das Verhältnis von FMN zu Riboflavin bei Inokulation des BES ausgeglichen. Allerdings konnte bereits nach 48 h eine Verschiebung des Verhältnisses zu > 95 % Riboflavin beobachtet werden (Marsili *et al.*, 2008). Die Betrachtung der Flavin-Sekretion in *S. oneidensis* liefert zunächst

## Diskussion

keine Erklärung für die Zusammensetzung der sekretierten Flavin-Spezies des Biofilms. Nach dem Modell von Covington und Kolleg:innen kommt es nach der Sekretion von FMN durch spontane Hydrolyse zur Bildung von Riboflavin. Wäre dies der Fall, so müsste die Riboflavin-Konzentration allerdings abhängig von der FMN-Konzentration steigen und ein ähnlicher Zusammenhang wie in der planktonischen Kultur wäre zu erwarten. Die Flavin-Konzentrationen des Biofilms weisen dagegen auf einen aktiven und wachstumsabhängigen Umwandlungsmechanismus der Zellen hin. Bei einer spontanen Hydrolyse von FMN zu Riboflavin wäre davon auszugehen, dass diese auch nach der Wachstumsphase stattfindet. Dies ist aber wie in Abbildung 16 zu sehen nicht der Fall. Eine weitere Möglichkeit die hohen Riboflavin-Konzentrationen zu erklären, besteht in einer direkten Sekretion von Riboflavin. In dem Modell von Covington und Kolleg:innen wird davon ausgegangen, dass Riboflavin über FMN zu FAD umgewandelt wird. FAD wird dann ins Periplasma transportiert und dort durch UshA zu FMN umgewandelt. FMN wird durch die äußere Membran sekretiert und kann zu Riboflavin hydrolysieren. Es ist aber nicht auszuschließen, dass es neben dem von Covington und Kolleg:innen beschriebenen Transport noch einen Riboflavin-spezifischen Transport gibt. Zusätzlich ist die Diffusion von Riboflavin durch die Membranen möglich. Xiao und Kolleg:innen konnten zeigen, dass extern zugegebenes Riboflavin durch die Zellmembranen diffundieren kann und in der Lage ist, Elektronen auf den unlöslichen Elektronenakzeptor 3-Nitrobenzensulfonat zu übertragen. Allerdings wurden in der Studie von Xiao und Kolleg:innen Riboflavin-Konzentrationen im mikromolaren Bereich verwendet, während die im Überstand des Biofilms detektierten Flavin-Konzentrationen im nanomolaren Bereich lagen (Xiao *et al.*, 2021). Es ist aber davon auszugehen, dass die intrazelluläre Flavin-Konzentration im Vergleich zur extrazellulären Flavin-Konzentration erhöht ist und dadurch ein Konzentrationsgefälle die Diffusion von Riboflavin durch die Zellmembran begünstigt.

Ein weiterer Effekt der durch die Experimente beobachtet werden konnte, ist, dass es innerhalb des Biofilms zu einer Anreicherung der Flavin-Spezies kommt. Dies kann durch die Rolle von Flavinen als Cofaktoren von äußeren Membrancytochromen erklärt werden. Ausgehend von einer Cytochrom-Konzentration von 1.000 – 30.000 Cytochromen/ $\mu\text{m}^2$  (Borloo *et al.*, 2007; Ross *et al.*, 2009) auf der äußeren Membran und einer durchschnittlichen Oberfläche von *S. oneidensis* von  $6,79 \mu\text{m}^2$  (Sturm *et al.*, 2015) ergeben sich 6.790 – 203.700 Cytochrome pro *S. oneidensis*-Zelle. Bei einer typischen Zellzahl von  $5,15 \times 10^{10}$  Zellen pro ml ergeben sich daraus zwischen  $3,49 \times 10^{14}$  und  $1,05 \times 10^{16}$  äußere Membrancytochrome pro ml. Die gemessene Riboflavin-Konzentration von 3.670 nM innerhalb des Biofilms entspricht dabei einer Konzentration von  $2,21 \times 10^{15}$  Riboflavin-Molekülen pro ml. Da ein äußeres

Membrancytochrom in der Lage ist, ein Flavin-Molekül zu binden, können die erhöhten Flavin-Konzentrationen innerhalb des Biofilms durch die Absorption der Flavine an äußere Membrancytochrome erklärt werden (Edel *et al.*, 2021). Des Weiteren scheint überwiegend Riboflavin als Cofaktor für äußere Membrancytochrome zu fungieren. Bisher veröffentlichte Studien gehen davon aus, dass sowohl FMN als auch Riboflavin als Cofaktor für *c*-Typ Cytochrome fungieren (Okamoto *et al.*, 2013; Okamoto, Nakamura, *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2016). Allerdings lassen die im Biofilm gemessenen Flavin-Konzentrationen die Verwendung von Riboflavin als Haupt-Cofaktor wahrscheinlich erscheinen.

## **2. Erweiterung des Produkt- und Substratspektrums mit optimierter Raum-Zeit-Ausbeute**

Ziel des zweiten Teils der hier vorgestellten Arbeit war die Erweiterung des Substrat- und Produktspektrums von *S. oneidensis* einhergehend mit optimierter Raum-Zeit-Ausbeute. Um dies zu ermöglichen, wurden die Gene zum Glukoseabbau sowie die Gene zur Acetoin synthese in *S. oneidensis* eingebracht. Zusätzlich wurde die Produktion des nativen Endprodukts Acetat durch Deletion der entsprechenden Gene unterbunden. Der resultierende Stamm wurde in einer Langzeitadaptation in einem BES eingesetzt. Nach der initialen Adaptation wurden resultierende Einzelklone auf Stromproduktion und Biofilmbildung in BES untersucht und die vielversprechendsten Klone resequenziert.

### **2.1. Stammentwicklung und Adaptation**

Um einen optimierten Produktionsprozess industriell zu etablieren, sind hohe Raum-Zeit-Ausbeuten unumgänglich. Die Synthese von Acetoin durch *S. oneidensis* konnte in der Vergangenheit bereits durch Bursac und Kolleg:innen etabliert werden. Allerdings sind die erreichten Raum-Zeit-Ausbeuten um ein Vielfaches geringer als in bereits etablierten oxischen Prozessen (Bursac *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2017). Zudem ist das Wachstum von *S. oneidensis* durch die Deletion der Acetatsynthese-Gene unter anoxischen Bedingungen deutlich vermindert. Dies ist durch die verringerte ATP-Synthese des Mikroorganismus bedingt. Nach einer Studie von Hunt und Koellig:innen ist die Substratstufenphosphorylierung unter anoxischen Bedingungen die Haupt-Energiequelle des Organismus (Hunt *et al.*, 2010). Durch die Deletion der Acetatsynthase, welche für eine hohe Umwandlungsrate von Laktat zu Acetoin unabdingbar ist, ist *S. oneidensis* nicht mehr in der Lage, Energie durch die Substratstufenphosphorylierung zu generieren. Dadurch ist das Wachstum des Organismus stark beeinträchtigt. Dieser Wachstumsnachteil kann allerdings durch die Etablierung von Glukose als Substrat in Teilen ausgeglichen werden. Die Umwandlung von Glukose zu

## Diskussion

Glukose-6-Phosphat benötigt zwar zunächst ein ATP, in der weiteren Umwandlung über den Entner-Doudoroff-Weg werden allerdings zwei ATP gewonnen. Dies lässt dem Mikroorganismus also ein ATP als Energieträger für zelluläre Prozesse.

Um einen optimierten Produktionsstamm zu erstellen, wurde auf Vorarbeiten von Thea Bursac aufgebaut (Bursac, 2015). Ausgehend von *S. oneidensis*  $\Delta\lambda$   $\Delta$ ackA pta wurde die Laktatdehydrogenase *ldhA* deletiert und in den Lokus die Gene zum Glukoseabbau eingebracht. Zur Acetoin-Produktion wurde das pBAD-Plasmid modifiziert. Um eine Expression der Gene auf dem Plasmid mit Glukose als Substrat zu ermöglichen, wurde der Arabinose-induzierbare Promotor gegen den nativen *cctA*-Promotor von *S. oneidensis* ausgetauscht. Hinter den *cctA*-Promotor wurden die Gene zur Acetoin-Synthese eingebracht. Der resultierende Stamm wurde durch Sequenzierung verifiziert und für die Langzeitadaptation verwendet.

Die Langzeitadaptation lief über einen Zeitraum von 83 Tagen. Allerdings traten bereits zu Beginn der Adaptation starke Schwankungen des pH-Werts auf. Bei einer vollständigen Umsetzung von Glukose zu Acetoin ist weder die Bildung von Basen noch von Säuren zu erwarten. Daher wurde initial angenommen, dass der pH-Wert weitgehend konstant bleibt. Das Sinken des pH-Werts weist auf die Bildung von Säuren hin. Diese scheinen trotz des durch 50 mM HEPES gepufferten Mediums einen drastischen Einfluss auf den pH-Wert zu haben. Es konnte bereits durch Nakagawa und Kolleg:innen gezeigt werden, dass *S. oneidensis* bei Verwendung von Glukose als Substrat in BES Laktat als Elektronenspeicherstoff akkumulieren kann (Nakagawa *et al.*, 2015). Die Akkumulation von Laktat sollte in der Adaptation durch die Deletion der Laktatdehydrogenase *ldhA* sowie durch das gewählte Anodenpotential verhindert werden. Im Genom von *S. oneidensis* sind zwei Laktatdehydrogenasen codiert. Während die Laktatdehydrogenase *ldhA* die Bildung von Laktat unter Regeneration von  $\text{NAD}^+$  katalysiert, interagiert die Laktatdehydrogenase *dld-II* mit dem Menaquinonpool (Kasai *et al.*, 2019). In der Studie von Nakagawa und Kolleg:innen konnte gezeigt werden, dass die Expression der Laktatdehydrogenase *ldh-II* mit steigendem Elektrodenpotential zunimmt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass bei einem Elektrodenpotential von 0,6 V gegen NHE Laktat vermehrt als Zwischenprodukt akkumuliert wird. Dagegen konnten bei einem Elektrodenpotential von 0,2 V gegen NHE nur sehr geringe Mengen Laktat detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass die Elektronen bei einem zu hohen Anodenpotential nicht schnell genug auf die Anode übertragen werden können und daher Laktat gebildet wird. Um einen Elektronenüberschuss innerhalb des Metabolismus zu verhindern, wurde daher ein Anodenpotential von 0 V gegen NHE gewählt. Dadurch sollte eine Akkumulation von Laktat oder Pyruvat verhindert werden. Des Weiteren

wurde die Laktatdehydrogenase *ldhA* deletiert. Diese wird potentialunabhängig exprimiert und trägt zusätzlich zur Umwandlung von Pyruvat zu Laktat bei (Nakagawa *et al.*, 2015). Der schwankende pH-Wert lässt allerdings darauf schließen, dass es dennoch zur Produktion von Säuren als Endprodukt kam. Die genaue Ursache für den schwankenden pH-Wert kann allerdings durch die fehlende Analyse der Endprodukte nicht abschließend geklärt werden.

### **2.2. Einfluss verschiedener Anodenpotentiale**

Um zu überprüfen, ob das Endproduktspektrum durch die Wahl des Anodenpotentials verändert werden kann, wurden die aus der initialen Adaptation resultierenden Einzelklone als Mischkultur bei einem Potential von 0 mV gegen NHE und einem Potential von 200 mV gegen NHE analysiert. Ausgehend von der Arbeit von Nakagawa und Kolleg:innen war die Erwartung, dass das niedrigere Potential mit einer geringeren Laktatakkumulation einhergeht. Des Weiteren war zu erwarten, dass der erhöhte Elektronenfluss bei höherem Potential mit einer gesteigerten Stromdichte und einem gesteigerten Stoffumsatz einhergeht. Tatsächlich war die Stromdichte bei erhöhtem Potential etwa um den Faktor 2,7 gesteigert. Das Endproduktspektrum war allerdings bei beiden Anodenpotentialen sehr ähnlich. Lediglich im Fall von Pyruvat konnte eine erhöhte Akkumulation bei hohem Anodenpotential festgestellt werden. Dies lässt darauf schließen, dass der zentrale Metabolismus des Organismus Glukose schneller abbaut als Endprodukte synthetisiert werden können. Bei Betrachtung der coulombschen Effizienz fällt auf, dass diese sehr niedrig ist. Theoretisch können in BES mit *S. oneidensis* coulombsche Effizienzen von 60 – 80 % erreicht werden (Mao and Verwoerd, 2014). Die hier erreichten coulombschen Effizienzen lagen allerdings bei 40 % (200 mV gegen NHE) und 20 % (0 mV gegen NHE). Niedrige coulombsche Effizienzen bedeuten, dass lediglich ein Teil der durch den Glukose-Abbau anfallenden Elektronen auf die Anode übertragen wird. Die restlichen Elektronen werden entweder zum Aufbau von Biomasse verwendet oder auf einen alternativen Elektronenakzeptor übertragen. Tatsächlich konnten bei beiden Anodenpotentialen deutliches Wachstum und die Bildung von Biofilm-Flocken beobachtet werden. Allerdings war durch die Flocken-Bildung des Biofilms keine zuverlässige Quantifizierung des Wachstums möglich. Es ist allerdings anzunehmen, dass neben Wachstum auch ein alternativer Elektronenakzeptor oder ein nicht detektiertes Endprodukt die niedrigen coulombschen Effizienzen bedingt. Da lediglich der Kopfraum der MECs mit Stickstoff über einen Sterilfilter begast wird, ist es möglich, dass ein Verstopfen des Sterilfilters zu vorübergehenden Ausfällen der Begasung und dadurch zum Eintritt von Sauerstoff geführt hat. Der eingetretene Sauerstoff wird von den Bakterien bevorzugt als Elektronenakzeptor verwendet und weniger Elektronen würden folglich auf die Anode übertragen werden.

In beiden Versuchsansätzen konnte kein Acetoin detektiert werden. Dies lässt darauf schließen, dass entweder im Rahmen der Adaptation eine Mutation innerhalb des Promotors oder der Acetoin synthese-Gene eingeführt wurde, oder dass die Gene zur Acetoin synthese von Beginn an nicht funktional exprimiert wurden. Der aus der fehlenden Acetoin-Produktion resultierende Kohlenstoff wird in die Laktatproduktion umgeleitet. Da die Laktatproduktion bei beiden Anodenpotentialen vergleichbar ist, scheint die Induktion der verantwortlichen Laktatdehydrogenase potentialunabhängig zu erfolgen. Dies steht im Gegensatz zu den Beobachtungen von Nakagawa und Kolleg:innen. Hier erfolgte die Induktion von *dld-II* und damit die Laktatproduktion durch *dld-II* abhängig vom Anodenpotential. Allerdings waren die von Nakagawa eingesetzten Glukose-Konzentrationen mit 2 mM deutlich geringer als die in dieser Arbeit eingesetzten Glukose-Konzentrationen von 50 mM. Durch die geringere Glukose-Konzentration und die damit verbundene langsamere Glukose-Aufnahme wurde möglicherweise eine Laktatassimilation durch die *dld-II* verhindert.

Des Weiteren scheint *S. oneidensis* trotz der Deletion der Acetatkinase und der Phosphotransacetylase in der Lage zu sein, Acetat zu synthetisieren. Ein Blick in das *S. oneidensis*-Genom zeigt, dass neben der Acetatsynthese durch *ackA* und *pta* ein alternativer Weg der Acetatsynthese möglich ist. So kann die Umwandlung von Acetyl-CoA zu Acetat theoretisch auch direkt durch die im *S. oneidensis*-Genom kodierte Acetyl-CoA-Hydrolase erfolgen (*SO\_1708*). In einem *S. oneidensis* WT konnte dieser Stoffwechselweg bisher noch nicht untersucht werden. Allerdings wurde bisher auch keine Acetatproduktion nach Deletion der primären Acetatsynthese-Gene beobachtet. In dieser Arbeit konnte somit zum ersten Mal eine alternative Acetatproduktion beobachtet werden.

### **2.3. Analyse der adaptierten Einzelklone**

Um den Metabolismus der adaptierten Einzelklone genauer zu untersuchen, wurde das Wachstum auf M4-Medium mit Eisencitrat als Elektronendonator untersucht. Die Einzelklone, die das schnellste Wachstum aufwiesen, wurden über einen Zeitraum von 86 h in BES analysiert. Dabei wurde zunächst nur die Stromdichte betrachtet. Im Folgenden wurde sowohl bei dem Ausgangsstamm als auch bei den Klonen 4B und 10A die Stromproduktion und die Biofilmbildung über einen Zeitraum von 140 h untersucht. Dabei wurde Klon 10A aufgrund der stark erhöhten mittleren Stromdichte und Klon 4B aufgrund des ungewöhnlichen Verlaufs der Stromkurve ausgewählt. Für gewöhnlich erreicht die Stromproduktion von *S. oneidensis* in BES innerhalb der ersten 24 h eine Plateau-Phase und es wird eine konstante Stromdichte erzeugt. Bei Klon 4B hingegen stieg die Stromdichte über einen Zeitraum von etwa 110 h. Der

langsame Stromanstieg kann durch eine langsam steigende Glukose-Umsetzungsrate oder eine langsame Anlagerung der Zellen an die Anode begründet sein. Um einen genaueren Einblick in den Metabolismus der Klone 10A und 4B zu erlangen, wurden die Genome der Klone resequenziert und mit dem Genom des Ausgangsstamms verglichen.

### **2.4. Genomische Anpassungen der adaptierten Einzelklone**

Um die genomischen Anpassungen der Einzelklone nach der Adaptation analysieren zu können und deren Bedeutung für den Produktionsprozess zu untersuchen, wurden die Genome der Klone 4B und 10A sequenziert. Die daraus resultierenden Daten wurden mit dem Genom des Ausgangsstamms abgeglichen und die durch die Adaptation entstandenen Mutationen wurden analysiert. Die Genom-Sequenzierungen resultierten in 8 (Klon 4B) und 7 (Klon 10A) Mutationen. Mithilfe der entstanden Mutationen und dem beobachteten Phänotyp in BES ist ein detaillierter Einblick in die Regulation der Biofilmbildung unter den Produktionsbedingungen möglich. Die identifizierten genomischen Veränderungen können dabei in zwei Gruppen eingeordnet werden. Zum einen wurden Basen deletiert, zum anderen kam es zum Austausch einzelner Basen. Eine Deletion einzelner Basen führt zu einem *frameshift*, also einer Veränderung des Leserasters in allen folgenden Basen. Dies hat bei Auftreten in den vorderen Proteinbereichen meist einen Funktionsverlust der Proteine zur Folge (Streisinger *et al.*, 1966). Dagegen kann der Austausch einzelner Basen und folglich einzelner Aminosäuren sowohl eine verbesserte, als auch eine verschlechterte Funktionalität des resultierenden Proteins zur Folge haben. Der vielversprechendste Weg zu einer aussagekräftigen Analyse besteht hier in der Klonierung der Mutation in einen WT-Hintergrund und einer vergleichenden Analyse der hypothetischen Funktion.

Unter den Mutationen in Klon 4B befand sich ein Basenaustausch in der Promotorregion von *SO\_2650*. Durch eine Studie von Deutschbauer und Kolleg:innen ist bereits bekannt, dass eine Transposon-Mutation in *SO\_2650* zu einer verringerten Biofilmbildung auf Soft-Agar führt (Deutschbauer *et al.*, 2011). Die genaue Funktion von *SO\_2650* ist allerdings unklar. Dennoch erscheint *SO\_2650* als interessanter Kandidat für weitere Analysen in Bezug auf die Biofilmbildung von *S. oneidensis* in BES. Neben *SO\_2650* wurde eine Basendeletion und ein Basenaustausch mit Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz in *pilU* (*SO\_3350*) identifiziert. Das Auftreten von zwei genomischen Veränderungen in demselben Gen lässt darauf schließen, dass das durch dieses Gen codierte Protein von entscheidender Bedeutung für den beobachteten Phänotyp von Klon 4B ist. Allerdings befindet sich der Basenaustausch nach der Basendeletion im Gen für *pilU*. Da die Translation nach einer Basendeletion allerdings zumeist zu einem nicht

## Diskussion

funktionalen Protein führt, hat der folgende Aminosäureaustausch vermutlich keine weiteren Auswirkungen auf das resultierende Protein. *PilU* codiert für eine ATPase zur Pilus-Retraktion und ist damit ein wichtiger Faktor in der bakteriellen Motilität. Aus einer Selektionsstudie von Tajima und Kolleg:innen ist bereits bekannt, dass eine Deletion von *pilU* mit einer gesteigerten elektrischen Leistung in *S. oneidensis* einhergeht (Tajima *et al.*, 2011). Des Weiteren wurde von Chiang und Burrows beschrieben, dass die Deletion von *pilU* in *P. aeruginosa* zu einer erhöhten Biofilmbildung unter statischen Bedingungen führt (Chiang and Burrows, 2003). Daher ist die erhöhte Biofilmbildung, welche in Klon 4B beobachtet werden konnte, vermutlich zumindest teilweise auf die Mutation in *pilU* zurückzuführen. Neben Genen, welche mutmaßlich die gesteigerte Biofilmbildung begründen, konnten auch Mutationen in den heterolog exprimierten Genen der Acetolaktatsynthase (*alsS*) und des Glukose-Importers (*galP*) identifiziert werden. Möglicherweise führt der Austausch von Valin zugunsten von Alanin in *galP* zu einer verbesserten Aufnahme von Glukose. Um dies abschließend zu untersuchen, sollte die Mutation gezielt in das Gen eingebracht und die Glukose-Aufnahmerate gesondert analysiert werden. Dass es zu einer Mutation im heterolog exprimierten Gen des Glukose-Importer, aber nicht zu einer Mutation im Gen der Glukokinase kam, deutet darauf hin, dass die Glukose-Aufnahme ein limitierender Schritt im Wachstum von *S. oneidensis* auf Glukose ist. Daher würde eine stärkere Expression von *galP* möglicherweise zu einer verbesserten Aufnahme von Glukose und damit zu einem erhöhten Substratumsatz führen. Die Mutation in *alsS* begründet möglicherweise die Verschiebung des Endproduktspektrums hin zu Laktat. Es ist denkbar, dass die Mutation in dem Gen der Acetolaktatsynthase zu einem nicht-funktionalen Protein führt und dadurch Pyruvat nicht zu Acetolaktat umgewandelt werden kann. Dies würde in Folge zur Akkumulation von Pyruvat und der Synthese von Laktat führen. Da allerdings nur in Klon 4B eine Mutation in den Acetoin-Synthesegenen zu finden ist, aber weder Klon 4B noch Klon 10A Acetoin synthetisieren, besteht vermutlich noch ein weiterer Engpass im Metabolismus von *S. oneidensis*, der die Acetoin synthese verhindert. Neben Mutationen in Genen der Biofilmbildung und des Glukoseabbaus sowie der Acetoin synthese konnte auch eine Mutation in *cusA* identifiziert werden. *CusA* codiert für eine Kupfer/Silber-Efflux-Pumpe und scheint daher auf den ersten Blick in keinem direkten Zusammenhang mit den beobachteten Phänotypen zu stehen. Allerdings wurde in beiden adaptierten Klonen eine Mutation in *cusA* detektiert. Das deutet darauf hin, dass *CusA* unter den gewählten Adaptationsbedingungen relevant ist. Möglicherweise kam es durch die lange Adaptation über 83 Tage zu einer Diffusion von Silberionen aus der Referenzelektrode. Silber wirkt toxisch auf *S. oneidensis* (Suresh *et al.*, 2010), weshalb eine Mutation in *cusA* einhergehend mit einer erhöhten Effizienz der Efflux-

## Diskussion

Pumpe einen Wachstumsvorteil bieten könnte. Die Mutationen im Promotorbereich von *SO\_4594* und in *SO\_1003* können bisher keiner Funktion zugeordnet werden. Beide Gene codieren für bisher nicht charakterisierte Proteine, über deren Funktion in *S. oneidensis* nichts bekannt ist.

Ebenso wie in Klon 4B konnten auch in Klon 10A einige Mutationen in Zusammenhang mit dem beobachteten Phänotyp in BES gebracht werden. So wurde in *SO\_0569*, einer Diguanylat-Zyklase, eine Base deletiert und damit ein *frameshift* eingeführt. Diguanylat-Zyklasen sind dafür bekannt, den zyklischen c-GMP Spiegel zu beeinflussen (Matsumoto *et al.*, 2021, Gambari *et al.*, 2018). Eine Erhöhung des zyklischen di-GMP-Spiegels führt in vielen Fällen zu einer gesteigerten Biofilmbildung (Chao *et al.*, 2013, Liu *et al.*, 2015, Matsumoto *et al.*, 2021). Momentan lässt sich noch nicht erklären, warum in diesem Fall eine nicht-funktionale Diguanylat-Zyklase die Biofilm-Bildung positiv beeinflussen könnte. Allerdings scheint es sich hier um kein zufälliges Mutationsereignis zu handeln, da es sich vollständig in der Population durchgesetzt hat. Außerdem zeigen unter anderem die Analysen dieser Arbeit, dass die Biofilmregulation unter anoxischen Bedingungen völlig anders zu funktionieren scheint als unter oxischen. Eventuell muss daher auch die Funktion von di-GMP unter anoxischen Bedingungen noch genauer untersucht werden. Neben *SO\_0569* konnte auch eine Deletion in *uvrY*, einem Regulator der Signal-Transduktion, identifiziert werden. UvrY bildet mit BarA ein Zwei-Komponenten-System, welches in *E. coli* die Bildung von Biofilm induziert (Suzuki *et al.*, 2002, Sakamoto *et al.*, 2012). Aus Studien mit *S. oneidensis* ist bekannt, dass UvrY die Expression von über 200 Genen beeinflusst und damit ein globaler Regulator des Zentralstoffwechsels ist (Binnenkade *et al.*, 2011). Zudem konnten Müller und Kolleg:innen zeigen, dass die Deletion von *uvrY* zu einem weniger dichten Biofilm führt (Müller *et al.*, 2013). Dies wiederum könnte in BES den Vorteil bieten, dass Flavine und andere Elektronenshuttle besser zwischen den Zellen und der Anode diffundieren können und dadurch den Elektronentransfer verbessern. Zudem werden durch einen weniger dichten Biofilm die Substratverfügbarkeit verbessert und mögliche isolierende Effekte der EPS vermindert. Allerdings wurden auch diese Ergebnisse unter oxischen Bedingungen zusammengetragen und die Übertragbarkeit auf anoxische Prozesse muss noch untersucht werden. Neben Genen, welche Einfluss auf die Biofilmbildung nehmen könnten, wurde auch ein Basenaustausch in dem Gen der Oxidoreduktase *FrmA* detektiert. *FrmA* kann laut Vorhersagen die Umsetzung von Ethanol, Formaldehyd oder Glutathion katalysieren (The UniProt Consortium, 2021). Die Funktion als Oxidoreduktase könnte allerdings auch die Umwandlung von Pyruvat zu Laktat ermöglichen und dadurch die potentialunabhängige Laktatakkumulation erklären. Wie schon in

## Diskussion

Klon 4B konnte auch in Klon 10A ein Basenaustausch in *cusA* identifiziert werden. Zudem wurden Basen in *pyrC*, *SO\_4366* und *SO\_4013* ausgetauscht. *PyrC* codiert für eine Dihydroorotase, welche eine tragende Rolle in der Pyrimidin-Synthese hat. Die beiden anderen Gene codieren für bisher nicht charakterisierte Proteine und konnten ebenso wie *pyrC* nicht in Zusammenhang mit dem beobachteten Phänotyp gebracht werden. Insgesamt konnten durch die Genom-Sequenzierungen der adaptierten Klone zahlreiche vielversprechende Kandidaten für eine gezielte Biofilmbildung in BES identifiziert werden. Des Weiteren konnten kaum Mutationen in den Genen zum Glukoseabbau identifiziert werden. Die Tatsache, dass der Glukoseabbau dennoch deutlich gesteigert wurde, lässt darauf schließen, dass weniger die Aufnahme oder der Abbau von Glukose limitierend sind. Vielmehr scheint die gesteigerte Biofilmbildung die erhöhten Glukose-Aufnahmeraten zu bedingen, was darauf hindeutet, dass die Verfügbarkeit der Anode als Elektronenakzeptor in dem verwendeten BES limitierend ist.

Allerdings können durch eine Genom-Sequenzierung alleine nur begrenzte Aussagen über die Auswirkungen der Veränderungen getroffen werden. Um den tatsächlichen Einfluss eines Basenaustauschs in der Promotoregion von Genen beurteilen zu können, ist die Analyse des zugehörigen Transkriptoms unabdingbar. Des Weiteren könnte sowohl die Auswirkung von UvrY als globaler Regulator als auch die Regulation des Glukoseabbaus und der Acetoin synthese durch eine vergleichende Transkriptom-Analyse des Ausgangsstamms und der Klone 4B und 10A untersucht werden. Hierdurch könnte die Expression der heterolog eingebrachten Gene verfolgt und Veränderungen in der Expression festgestellt werden. Zudem würde die Expression von Schlüsselgenen, welche den Kohlenstoff in die Laktatproduktion umleiten, erkannt und eine Umleitung des Kohlenstoffs könnte im Folgenden durch Deletion dieser Gene verhindert werden. Die genaue Analyse der Regulation durch eine vergleichende Transkriptom-Analyse war Ziel einer in Auftrag gegebenen Illumina-Sequenzierung. Diese konnte aufgrund der aktuellen Covid-19 Pandemie und damit verbundener Lieferengpässe von Materialien zur Illumina-Sequenzierung im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht durchgeführt werden. Daher steht die Analyse der vergleichenden Transkriptome zur genaueren Identifizierung der Schlüsselgene in der Acetoinproduktion noch aus.

Eine andere Möglichkeit zur weiteren Analyse der durch die Genom-Resequenzierungen ermittelten Kandidaten für die beobachteten Phänotypen ist die Klonierung der Mutationen in *S. oneidensis* WT und deren Untersuchung in BES. So könnten eindeutige Auswirkungen der Mutationen identifiziert werden und die Funktion der betreffenden Gene unter den Produktionsbedingungen analysiert werden. Um einen weiter optimierten Produktionsstamm

zu erstellen, sollten im Anschluss Mutationen mit positiven Auswirkungen auf die Glukose-Aufnahmerate, die Biofilmbildung und die Acetoin synthese in einem finalen Produktionsstamm vereint werden. Dieser könnte durch die vermutlich stark erhöhten Stromdichten einen wertvollen Beitrag zur Produktion von Basischemikalien mithilfe von BES leisten.

### 3. Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Biofilmbildung von *S. oneidensis* unter anoxischen Bedingungen, sowie die genetische Optimierung und Adaptation des Mikroorganismus hin zu einem optimierten Produktionsstamm.

Dazu wurde zunächst die Riboflavin-induzierte Biofilmbildung genauer betrachtet und deren biologische Relevanz untersucht. Aus den vorgelegten Ergebnissen wird deutlich, dass Riboflavin als *Quorum sensing*-Molekül fungiert und die Ornithin-Decarboxylase *speC* als Zielgen induziert. Dabei weist Riboflavin nicht alle klassischen Merkmale von *Quorum sensing*-Molekülen Gram-negativer Mikroorganismen auf. So ist Riboflavin weder ein Acylhomoserin noch konnte eine Autoinduktion der Signalkaskade beobachtet werden. Allerdings wurde bereits in *S. baltica* ein nicht-kanonisches *Quorum sensing*-System beschrieben (Zhu *et al.*, 2015). Dies führt zur Vermutung, dass alternative *Quorum sensing*-Mechanismen innerhalb von *Shewanella*-Spezies eine Besonderheit sind. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen deutlich, dass die wachstumsabhängige Produktion von Riboflavin ab einem Schwellenwert zur Induktion der Ornithin-Decarboxylase *speC* führt. Diese Induktion führt vermutlich über Protein-Protein-Interaktionen zu einer verstärkten Biofilmbildung. Die genaue Funktionsweise dieses Prozesses konnte in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Die Ergebnisse erhärten allerdings die Vermutung, dass die erhöhte Stromdichte und Biofilmbildung unter anderem durch die Regulation der Polysaccharid-Zusammensetzung durch WbpP und WbpA beeinflusst werden. Zur weiteren Aufklärung der Regulation der Riboflavin-induzierten Biofilmbildung ist eine genaue Analyse der durch die *speC*-Überexpression signifikant regulierten Proteine nötig. Hierbei sollte ein besonderes Augenmerk auf die Untersuchung der Glukose-1-Phosphat-Thymidyltransferase RmlA sowie das RNA-Chaperon ProQ gelegt werden. Die Überexpression von RmlA könnte einen Einfluss auf die Synthese von Lipopolysacchariden und EPS haben, was die Biofilmbildung maßgeblich beeinflussen kann (Huang *et al.*, 2006). Dagegen fungiert ProQ als RNA-Chaperon und hat damit Einfluss auf die Translation. Da die Überexpression von ProQ in *E. coli* einen positiven

Einfluss auf die Biofilmbildung hat, sollte die Funktion von ProQ auch in *S. oneidensis* genauer untersucht werden (Sheidy and Zielke, 2013).

Neben der Aufklärung der Funktion von Riboflavin als *Quorum sensing*-Molekül wurde in dieser Arbeit ein optimierter Produktionsstamm erstellt. Dieser sollte unter Verwendung von Glukose als Substrat erhöhte Stromdichten und Acetoin-Ausbeuten ermöglichen. Durch das gewählte Adaptationsverfahren sollte zudem die Biofilmbildung unter den Produktionsbedingungen verbessert werden. Die Stromdichte und damit die Glukose-Umsatzrate konnte durch die Adaptation des Produktionsstammes um das 7-fache gesteigert werden. Zusätzlich wurde die Biofilmbildung des adaptierten Stammes um den Faktor 2,5 erhöht. Eine Acetoin-Produktion konnte in dieser Arbeit nicht etabliert werden, da der Kohlenstoff in die Produktion von Laktat umgeleitet wurde. Durch Genom-Resequenzierungen zweier adaptierter Einzelklone konnten allerdings wichtige Schlüsselemente für die anaerobe Biofilmbildung identifiziert werden. Diese Schlüsselemente könnten in zukünftigen Produktionsstämmen gezielt die Biofilmbildung einhergehend mit der Substratumsatzrate erhöhen. Zur weiteren Analyse der Acetoin-Produktion sollte zukünftig durch eine Transkriptom-Analyse festgestellt werden, ob die heterolog eingebrachten Gene exprimiert werden. Eine solche vergleichende Transkriptom-Analyse war Ziel einer in Auftrag gegebenen Illumina-Sequenzierung. Diese konnte allerdings aufgrund der aktuellen Covid-19 Pandemie und damit verbundener Lieferengpässe von Materialien zur Illumina-Sequenzierung im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden. Sollten die Ergebnisse der Transkriptom-Analyse keine Expression der Gene zur Acetoin-Synthese zeigen, so wäre zunächst der Austausch des Promotors und eine Optimierung der *codon usage* sinnvoll. Dadurch könnte sichergestellt werden, dass *S. oneidensis* in der Lage ist, die zur Acetoin-Synthese benötigten Enzyme in ausreichenden Mengen zu synthetisieren. Des Weiteren könnte durch die Transkriptom-Analyse ermittelt werden, welche Gene zur Produktion von Laktat als Endprodukt führen. Diese könnten im Folgenden deletiert werden und so der Kohlenstoff-Fluss Richtung Acetoin-Produktion erhöht werden.

Durch die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die Schlüsselgene zur Biofilmbildung in BES kann ein zukünftiger Produktionsstamm gezielt an die Produktionsbedingungen angepasst werden. Des Weiteren könnten durch die ausstehende Transkriptom-Analyse die Engpässe der Acetoin-Produktion ermittelt und folglich überwunden werden. So könnte ein Produktionsstamm mit Raum-Zeit-Ausbeuten erstellt werden, welcher

## Diskussion

kompetitiv zu bereits bestehenden oxischen Produktionsroutinen die Herstellung von Acetoin als Basischemikalie ermöglicht.

## V. Literatur

Aldea, M., Hernández-Chico, C., la Campa, A. G. de, Kushner, S. R., and Vicente, M. (1988) Identification, cloning, and expression of *bolA*, an *ftsZ*-dependent morphogene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **170**: 5169–5176.

Arinda, T., Philipp, L.-A., Rehnlund, D., Edel, M., Chodorski, J., Stöckl, M., *et al.* (2019) Addition of Riboflavin-Coupled Magnetic Beads Increases Current Production in Bioelectrochemical Systems via the Increased Formation of Anode-Biofilms. *Front Microbiol* **10**: 126.

Bacher, A., Eberhardt, S., Fischer, M., Kis, K., and Richter, G. (2000) Biosynthesis of vitamin B2 (riboflavin). *Annu Rev Nutr* **20**: 153–16.

Bao, H., Zheng, Z., Yang, B., Liu, D., Li, F., Zhang, X., *et al.* (2016) In situ monitoring of *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilm growth on gold electrodes by using a Pt microelectrode. *Bioelectrochemistry* **109**: 95–100.

Bauer, A., Wagner, M., Saravia, F., Bartl, S., Hilgenfeldt, V., and Horn, H. (2019) In-situ monitoring and quantification of fouling development in membrane distillation by means of optical coherence tomography. *J Memb Sci* **577**: 145–152.

Benthum, W. A. J. van, Loosdrecht, M.D.M. van, and Heijnen, J. J. (1997) Control of heterotrophic layer formation on nitrifying biofilms in a biofilm airlift suspension reactor. *Biotechnol Bioeng* **53**: 397–405.

Binnenkade, L., Lassak, J., and Thormann, K. M. (2011) Analysis of the BarA/UvrY two-component system in *Shewanella oneidensis* MR-1. *PLoS One* **6**: e23440.

Borloo, J., Vergauwen, B., Smet, L. De, Brigé, A., Motte, B., Devreese, B., and Beeumen, J. Van (2007) A kinetic approach to the dependence of dissimilatory metal reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 on the outer membrane cytochromes *c* OmcA and OmcB. *FEBS J* **274**: 3728–3738.

Borselli, D., Blanchet, M., Bolla, J. M., Muth, A., Skrubber, K., Phanstiel, O., and Brunel, J. M. (2017) Motuporamine derivatives as antimicrobial agents and antibiotic enhancers against resistant Gram-negative bacteria. *ChemBioChem* **18**: 276–283.

Bouwer, E. J., and Crowe, P. B. (2018) Biological processes in drinking water treatment. *J Am Water Works Assoc* **80**: 82–93.

- Bouyssié, D., Hesse, A.-M., Mouton-Barbosa, E., Rompais, M., Macron, C., Carapito, C., *et al.* (2020) Proline: an efficient and user-friendly software suite for large-scale proteomics. *Bioinformatics* **36**: 3148–3155.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248–254.
- Brutinel, E. D., and Gralnick, J. A. (2012) Shuttling happens: Soluble flavin mediators of extracellular electron transfer in *Shewanella*. *Appl Microbiol Biotechnol* **93**: 41–48.
- Bursać, T. (2015) Mikroben-Elektroden-Interaktion als Werkzeug in der mikrobiellen Biotechnologie. Karlsruher Institut für Technologie.
- Bursać, T., Gralnick, J. A., and Gescher, J. (2017) Acetoin production via unbalanced fermentation in *Shewanella oneidensis*. *Biotechnol Bioeng* **114**: 1283–1289.
- Canstein, H. von, Ogawa, J., Shimizu, S., and Lloyd, J. R. (2008) Secretion of flavins by *Shewanella* species and their role in extracellular electron transfer. *Appl Environ Microbiol* **74**: 615–23.
- Cao, B., Shi, L., Brown, R. N., Xiong, Y., Fredrickson, J. K., Romine, M. F., Marshall, M. J., Lipton, M. S., Beyenal, H. (2011) Extracellular polymeric substances from *Shewanella* sp. HRCR-1 biofilms: Characterization by infrared spectroscopy and proteomics. *Environ Microbiol* **13**: 1018–1031.
- Champagne, P., and Li, C. (2009) Enzymatic hydrolysis of cellulosic municipal wastewater treatment process residuals as feedstocks for the recovery of simple sugars. *Bioresour Technol* **100**: 5700–5706.
- Chao, L., Rakshe, S., Leff, M., and Spormann, A. M. (2013) PdeB, a cyclic Di-GMP-specific phosphodiesterase that regulates *Shewanella oneidensis* MR-1 motility and biofilm formation. *J Bacteriol* **195**: 3827–3.
- Chiang, P., and Burrows, L. L. (2003) Biofilm formation by hyperpiliated mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **185**: 2374–2378.
- Choi, D., Lee, S. B., Kim, S., Min, B., Choi, I.-G., and Chang, I. S. (2014) Metabolically engineered glucose-utilizing *Shewanella* strains under anaerobic conditions. *Bioresour Technol* **154**: 59–66.

- Chubiz, L. M., and Marx, C. J. (2017) Growth trade-offs accompany the emergence of glycolytic metabolism in *Shewanella oneidensis* MR-1. *J Bacteriol* **199**: e00827-16.
- Clancy, K. W., Melvin, J. A., and McCafferty, D. G. (2010) Sortase transpeptidases: insights into mechanism, substrate specificity, and inhibition. *Biopolymers* **94**: 385–396.
- Clark, I. C., Melnyk, R. A., Younblut, M. D., Carlson, H. K., Iavarone, A. T., and Coates, J. D. (2015) Synthetic and evolutionary construction of a chlorate-reducing *Shewanella oneidensis* MR-1. *MBio* **6**: 1–10.
- Clarke, T. A., Edwards, M. J., Gates, A. J., Hall, A., White, G. F., Bradley, J., Reardon, C. L., Shi, L., Beliaev, A. S., Marshall, M. J., Wang, Z., Watmough, N. J., Fredrickson, J. K., Zachara, J. M., Butt, J. N., and Richardson, D. J. (2011) Structure of a bacterial cell surface decaheme electron conduit. *Proc Natl Acad Sci* **108**: 9384–9389.
- Comfort, D. and Clubb, R. T. (2004) A Comparative Genome Analysis Identifies Distinct Sorting Pathways in Gram-Positive Bacteria. *Infect Immun* **72**: 2710–2722.
- Cotter, P. A. and Stibitz, S. (2007) c-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation. *Curr Opin Microbiol* **10**: 17–23.
- Covington, E. D., Gelbmann, C. B., Kotloski, N. J., and Gralnick, J. A. (2010) An essential role for UshA in processing of extracellular flavin electron shuttles by *Shewanella oneidensis*. *Mol Microbiol* **78**: 519–532.
- Creuzenet, C., Belanger, M., Wakarchuk, W. W., and Lam, J. S. (2000) Expression, purification, and biochemical characterization of WbpP, a new UDP-GlcNAc C4 epimerase from *Pseudomonas aeruginosa* serotype O6. *J Biol Chem* **275**: 19060–19067.
- Dauner, M., Sonderegger, M., Hochuli, M., Szyperski, T., Wüthrich, K., Hohmann, H. P., Sauer, U., and Bailey, J. E. (2002) Intracellular carbon fluxes in riboflavin-producing *Bacillus subtilis* during growth on two-carbon substrate mixtures. *Appl Environ Microbiol* **68**: 1760–1771.
- Deutschbauer, A., Price, M. N., Wetmore, K. M., Shao, W., Baumohl, J. K., Xu, Z., Nguyen, M., Tamse, R., Davis, R. W., Arkin, A. P. (2011) Evidence-based annotation of gene function in *Shewanella oneidensis* MR-1 using genome-wide fitness profiling across 121 conditions. *PLoS Genet* **7**: e1002385.

- Dheilly, A., Linossier, I., Darchen, A., Hadjiev, D., Corbel, C., and Alonso, V. (2008) Monitoring of microbial adhesion and biofilm growth using electrochemical impedancemetry. *Appl Microbiol Biotechnol* **79**: 157–164.
- Edel, M., Sturm, G., Sturm-Richter, K., Wagner, M., Novion-Ducassou, J., Couté, Y., Horn, H., Gescher, J. (2021). Extracellular riboflavin induces anaerobic biofilm formation in *Shewanella oneidensis*. *Biotechnol Biofuels* 10.1186.
- Flemming, H.-C. (2002) Biofouling in water systems – cases, causes and countermeasures. *Appl Microbiol Biotechnol* **59**: 629–640.
- Flemming, H.-C. and Wingender, J. (2010) The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* **8**: 623–633.
- Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., and Kjelleberg, S. (2016) Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* **14**: 563–575.
- Flynn, J. M., Ross, D. E., Hunt, K. A., Bond, D. R., and Gralnick, J. A. (2010) Enabling Unbalanced Fermentations by Using Engineered Electrode-Interfaced Bacteria. *MBio* **1**.
- Fuqua, W. C., Winans, S. C., and Greenberg, E. P. (1994) Quorum sensing in bacteria: The LuxR-LuxI family of cell density- responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* **176**: 269–275.
- Gambari, C., Boyeldieu, A., Armitano, J., Méjean, V., and Jurlin-Castelli, C. (2019) Control of pellicle biogenesis involves the diguanylate cyclases PdgA and PdgB, the c-di-GMP binding protein MxdA and the chemotaxis response regulator CheY3 in *Shewanella oneidensis*. *Environ Microbiol* **21**: 81–97.
- Gao, L., Lu, X., Liu, H., Li, J., Li, W., Song, R., Wang, R., Zhang, D., and Zhu, J. (2019) Mediation of Extracellular Polymeric Substances in Microbial Reduction of Hematite by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Front Microbiol* **10**: 575.
- Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., and Smith, H. O. (2009) Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods* **6**: 343–345.
- Gralnick, J. A. and Newman, D. K. (2007) Extracellular respiration. *Mol Microbiol* **65**: 1–11.
- Güssow, D. and Clackson, T. (1989) Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* **17**: 4000.

## Literatur

- Guzman, L.-M., Belin, D., Carson, M. J., and Beckwith, J. (1995) Tight Regulation, Modulation, and High-Level Expression by Vectors Containing the Arabinose P BAD Promoter. *J Bacteriol* **177**: 4121-30.
- Hackbarth, M., Jung, T., Reiner, J. E., Gescher, J., Horn, H., Hille-Reichel, A., and Wagner, M. (2020) Monitoring and quantification of bioelectrochemical *Kyrpidia spormannii* biofilm development in a novel flow cell setup. *Chem Eng J* **390**: 124604.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., and Stoodley, P. (2004) Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* **2**: 95–108.
- Hansen, S. H., Kabbeck, T., Radtke, C. P., Krause, S., Krolitzki, E., Peschke, T., Gasmi, J., Rabe, S. K., Wagner, M., Horn, H., Hubbuch, J., Gescher, J., and Niemeyer, C. (2019) Machine-assisted cultivation and analysis of biofilms. *Sci Rep* **9**: 8933
- Heidelberg, J. F., Paulsen, I. T., Nelson, K. E., Gaidos, E. J., Nelson, W. C., Read, T. D., Eisen, J. A., Seshadri, R., Ward, N., Methe, B., Clayton, R. A., Meyer, T., Tsapin, A., Scott, J., Beanan, M., Brinkac, L., Daugherty, S., DeBoy, R. T., Dodson, R. J., and Fraser, C. M. (2002). Genome sequence of the dissimilatory metal ion-reducing bacterium *Shewanella oneidensis*. *Nat Biotechnol* **20**(11): 1118–1123.
- Herbert-Guillou, D., Tribollet, B., Festy, D., and Ki  n  , L. (1999) In situ detection and characterization of biofilm in waters by electrochemical methods. *Electrochim Acta* **45**: 1067–1075.
- Huang, T. P., Somers, E. B., and Wong, A. C. L. (2006) Differential biofilm formation and motility associated with lipopolysaccharide/exopolysaccharide-coupled biosynthetic genes in *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Bacteriol* **188**: 3116–3120.
- Hunt, K. A., Flynn, J. M., Naranjo, B., Shikhare, I. D., and Gralnick, J. A. (2010) Substrate-level phosphorylation is the primary source of energy conservation during anaerobic respiration of *Shewanella oneidensis* strain MR-1. *J Bacteriol* **192**: 3345–3351.
- Irie, Y., and Parsek, M. R. (2008) Quorum sensing and microbial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* **322**: 67–84.
- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*, 28(1), 27–30

- Karatan, E., Duncan, T. R., and Watnick, P. I. (2005) NspS, a predicted polyamine sensor, mediates activation of *Vibrio cholerae* biofilm formation by norspermidine. *J Bacteriol* **187**: 7434–7443.
- Karatan, E. and Michael, A. J. (2013) A wider role for polyamines in biofilm formation. *Biotechnol Lett* **35**: 1715–1717.
- Kasai, T., Suzuki, Y., Kouzuma, A., and Watanabe, K. (2019) Roles of D-lactate dehydrogenases in the anaerobic growth of *Shewanella oneidensis* MR-1 on sugars. *Appl Environ Microbiol* **85**: e02668-18.
- Kees, E. D., Pendleton, A. R., Paquete, C. M., Arriola, M. B., Kane, A. L., Kotloski, N. J., Intile, P. J., and Gralnick, J. A. (2019) Secreted Flavin Cofactors for Anaerobic Respiration of Fumarate and Urocanate by *Shewanella oneidensis*: Cost and Role. *Appl Environ Microbiol* **85**: e00852-19.
- Kerisit, S., Rosso, K. M., Dupuis, M., and Valiev, M. (2007) Molecular Computational Investigation of Electron-Transfer Kinetics Across Cytochrome–Iron Oxide Interfaces. *J Phys Chem C* **30**: 11363-11375.
- Kipf, E., Koch, J., Geiger, B., Erben, J., Richter, K., Gescher, J., Zengerle, R., and Kerzenmacher, S. (2013) Systematic screening of carbon-based anode materials for microbial fuel cells with *Shewanella oneidensis* MR-1. *Bioresour Technol* **146**: 386–392.
- Kipf, E., Zengerle, R., Gescher, J., and Kerzenmacher, S. (2014) How Does the Choice of Anode Material Influence Electrical Performance? A Comparison of Two Microbial Fuel Cell Model Organisms. *ChemElectroChem* **1**: 1849–1853.
- Kitayama, M., Koga, R., Kasai, T., Kouzuma, A., and Watanabe, K. (2017) Structures, compositions, and activities of live *Shewanella* biofilms formed on graphite electrodes in electrochemical flow cells. *Appl Environ Microbiol* **83**: e00903-17.
- Kotloski, N. J. and Gralnick, J. A. (2013) Flavin electron shuttles dominate extracellular electron transfer by *Shewanella oneidensis*. *MBio* **4**: e00553-12.
- Kouzuma, A., Oba, H., Tajima, N., Hashimoto, K., and Watanabe, K. (2014) Electrochemical selection and characterization of a high current-generating *Shewanella oneidensis* mutant with altered cell-surface morphology and biofilm-related gene expression. *BMC Microbiol* **14**: 190.

- Krasteva, P. V., Giglio, K. M., and Sondermann, H. (2012) Sensing the messenger: The diverse ways that bacteria signal through c-di-GMP. *Protein Sci* **21**: 929–948.
- Labbate, M., Queck, S. Y., Koh, K. S., Rice, S. A., Givskov, M., and Kjelleberg, S. (2004) Quorum Sensing-Controlled Biofilm Development in *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol* **186**: 692–698.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- Lee, K.-J., Kim, J.-A., Hwang, W., Park, S.-J., and Lee, K.-H. (2013) Role of capsular polysaccharide (CPS) in biofilm formation and regulation of CPS production by quorum-sensing in *Vibrio vulnificus*. *Mol Microbiol* **90**: 841–857.
- Lide, D. R. (2010) CRC Handbook of Chemistry and Physics, 87th ed Editor-in-Chief: David R. Lide. *J Am Chem Soc* **129**: 724–724.
- Liu, H., Grot, S., and Logan, B. E. (2005) Electrochemically assisted microbial production of hydrogen from acetate. *Environ Sci Technol* **39**: 4317–4320.
- Liu, T., Yu, Y.-Y., Deng, X.-P., Ng, C. K., Cao, B., Wang, J.-Y., Rice, S. A., Kjelleberg, S., and Song, H. (2015) Enhanced *Shewanella* biofilm promotes bioelectricity generation. *Biotechnol Bioeng* **112**: 2051–2059.
- Lovley, D. R., Fraga, J. L., Blunt-Harris, E. L., Hayes, L. A., Phillips, E. J. P., and Coates, J. D. (1998) Humic substances as a mediator for microbially catalyzed metal reduction. *Acta Hydrochim Hydrobiol* **26**: 152–157.
- Lovley, D. R., and Phillips, E. J. (1988) Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. *Appl Environ Microbiol* **54**: 1472–80.
- Lovley, D. R., and Walker, D. J. F. (2019) *Geobacter* Protein Nanowires. *Front Microbiol* **10**: 2078.
- Lutz, R., and Bujard, H. (1997) Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. *Nucleic Acids Res* **25**: 1203–1210.
- Malvankar, N. S., and Lovley, D. R. (2012) Microbial nanowires: A new paradigm for

biological electron transfer and bioelectronics. *ChemSusChem* **5**: 1039–1046.

Mao, L., and Verwoerd, W.S. (2014) Theoretical exploration of optimal metabolic flux distributions for extracellular electron transfer by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Biotechnol Biofuels* **7**: 1–20.

Marcus, R. A., and Sutin, N. (1985) Electron transfers in chemistry and biology. *BBA Rev Bioenerg* **811**: 265–322.

Marraffini, L. A., DeDent, A. C., and Schneewind, O. (2006) Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of Gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 192–221.

Marsili, E., Baron, D. B., Shikhare, I. D., Coursolle, D., Gralnick, J. A., and Bond, D. R. (2008) *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *Proc Natl Acad Sci* **105**: 3968–3973.

Matsumoto, A., Koga, R., Kanaly, R. A., Kouzuma, A., and Watanabe, K. (2021) Identification of a diguanylate cyclase that facilitates biofilm formation on electrodes by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Appl Environ Microbiol* **87**: 1–11.

McMillan, D. G. G., Marritt, S. J., Butt, J. N., and Jeuken, L. J. C. (2012) Menaquinone-7 is specific cofactor in tetraheme quinol dehydrogenase CymA. *J Biol Chem* **287**: 14215–25.

Meshulam-Simon, G., Behrens, S., Choo, A. D., and Spormann, A. M. (2007) Hydrogen metabolism in *Shewanella oneidensis* MR-1. *Appl Environ Microbiol* **73**: 1153–1165.

Mitchell, A. C., Peterson, L., Reardon, C. L., Reed, S. B., Culley, D. E., Romine, M. R., and Geesey, G. G. (2012) Role of outer membrane *c*-type cytochromes MtrC and OmcA in *Shewanella oneidensis* MR-1 cell production, accumulation, and detachment during respiration on hematite. *Geobiology* **10**: 355–370.

Müller, J., Shukla, S., Jost, K. A., and Spormann, A. M. (2013) The *mxd* operon in *Shewanella oneidensis* MR-1 is induced in response to starvation and regulated by ArcS/ArcA and BarA/UvrY. *BMC Microbiol* **13**: 119.

Müller, V. (2008) Bacterial Fermentation. *eLS* 10.1002

Muñoz-Berbel, X., Muñoz, F. J., Vigués, N., and Mas, J. (2006) On-chip impedance measurements to monitor biofilm formation in the drinking water distribution network. *Sensors Actuators, B Chem* **118**: 129–134.

## Literatur

- Myers, J. M., and Myers, C. R. (2000) Role of the tetraheme cytochrome CymA in anaerobic electron transport in cells of *Shewanella putrefaciens* MR-1 with normal levels of menaquinone. *J Bacteriol* **182**: 67–75.
- Nakagawa, G., Kouzuma, A., Hirose, A., Kasai, T., Yoshida, G., and Watanabe, K. (2015) Metabolic characteristics of a glucose-utilizing *Shewanella oneidensis* strain grown under electrode-respiring conditions. *PLoS One* **10**: e0138813..
- Neal, A. L., Rosso, K. M., Geesey, G. G., Gorby, Y. A., and Little, B. J. (2003) Surface structure effects on direct reduction of iron oxides by *Shewanella oneidensis*. *Geochim Cosmochim Acta* **67**: 4489–4503.
- Ng, C. K., Xu, J., Cai, Z., Yang, L., Thompson, I. P., Huang, W. E., and Cao, B. (2020) Elevated intracellular cyclic-di-GMP level in *Shewanella oneidensis* increases expression of *c*-type cytochromes. *Microb Biotechnol* **13**: 1904–1916.
- Niou, Y.-K., Wu, W.-L., Lin, L.-C., Yu, M.-S., Shu, H.-Y., Yang, H.-H., and Lin, G.-H. (2009) Role of *galE* on biofilm formation by *Thermus spp.* *Biochem Biophys Res Commun* **390**: 313–318.
- Okamoto, A., Hashimoto, K., Neelson, K. H., and Nakamura, R. (2013) Rate enhancement of bacterial extracellular electron transport involves bound flavin semiquinones. *Proc Natl Acad Sci* **110**: 7856–7861.
- Okamoto, A., Nakamura, R., Neelson, K. H., and Hashimoto, K. (2014a) Bound flavin model suggests similar electron-transfer mechanisms in *Shewanella* and *Geobacter*. *ChemElectroChem* **1**: 1808–1812.
- Okamoto, A., Saito, K., Inoue, K., Neelson, K. H., Hashimoto, K., and Nakamura, R. (2014b) Uptake of self-secreted flavins as bound cofactors for extracellular electron transfer in *Geobacter* species. *Energy Environ Sci* **7**: 1357–1361.
- P. de Carvalho, M., and Abraham, W.-R. (2012) Antimicrobial and biofilm inhibiting diketopiperazines. *Curr Med Chem* **19**: 3564–3577.
- Pallen, M. J., Lam, A. C., Antonio, M., and Dunbar, K. (2001) An embarrassment of sortases-A richness of substrates? *Trends Microbiol* **9**: 97–101.
- Papenfort, K., and Bassler, B. L. (2016) *Quorum sensing* signal-response systems in Gram-

negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* **14**: 576–588.

Park, N. Y., Lee, J. H., Kim, M. W., Jeong, H. G., Lee, B. C., Kim, T. S., and Choi, S. H. (2006) Identification of the *Vibrio vulnificus wbpP* gene and evaluation of its role in virulence. *Infect Immun* **74**: 721–728.

Patel, C. N., Wortham, B. W., Lines, J. L., Fetherston, J. D., Perry, R. D., and Oliveira, M. A. (2006) Polyamines are essential for the formation of plague biofilm. *J Bacteriol* **188**: 2355–2363.

Percival, S. L., Vuotto, C., Donelli, G., and Lipsky, B. A. (2015) Biofilms and wounds: An identification algorithm and potential treatment options. *Adv Wound Care* **4**: 389–397.

Philipp, L.-A., Edel, M., and Gescher, J. (2020) Genetic engineering for enhanced productivity in bioelectrochemical systems. In *Adv Appl Microbiol* **111**: 1-31.

Pinchuk, G. E., Ammons, C., Culley, D. E., Li, S. M. W., McLean, J. S., Romine, M. F., Nealson, K. H., Fredrickson, J. K., and Beliaev, A. S. (2008) Utilization of DNA as a sole source of phosphorus, carbon, and energy by *Shewanella spp.*: Ecological and physiological implications for dissimilatory metal reduction. *Appl Environ Microbiol* **74**: 1198–1208.

Rabaey, K., Angenent, L., Schroder, U., and Keller, J. (2009) Bioelectrochemical systems: From extracellular electron transfer to biotechnological application. *IWA Publishing* p. 39 ff.

Reguera, G., McCarthy, K. D., Mehta, T., Nicoll, J. S., Tuominen, M. T., and Lovley, D. R. (2005) Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature* **435**: 1098–1101.

Richter, K., Schicklberger, M., and Gescher, J. (2012) Dissimilatory reduction of extracellular electron acceptors in anaerobic respiration. *Appl Environ Microbiol* **78**: 913–921.

Rodionov, D. A., Yang, C., Li, X., Rodionova, I. A., Wang, Y., Obraztsova, A. Y., Zagnitko, O. P., Overbeek, R., Romine, M. F., Reed, S., Fredrickson, J. K., Nealson, K. H., and Osterman, A. L. (2010) Genomic encyclopedia of sugar utilization pathways in the *Shewanella* genus. *BMC Genomics* **11**: 494.

Ross, D. E., Brantley, S. L., and Tien, M. (2009) Kinetic characterization of OmcA and MtrC, terminal reductases involved in respiratory electron transfer for dissimilatory iron reduction in *Shewanella oneidensis* MR-1. *Appl Environ Microbiol* **75**: 5218–5226.

Sakamoto, A., Terui, Y., Yamamoto, T., Kasahara, T., Nakamura, M., Tomitori, H., Yamamoto,

## Literatur

- K., Ishihama, A., Michael, A. J., Igarashi, K., Kashiwagi, K. (2012) Enhanced biofilm formation and/or cell viability by polyamines through stimulation of response regulators UvrY and CpxR in the two-component signal transducing systems, and ribosome recycling factor. *Int J Biochem Cell Biol* **44**: 1877–1886.
- Sakuragi, Y., and Kolter, R. (2007) Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (*pel*) of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **189**: 5383–5386.
- Salveti, A., Couté, Y., Epstein, A., Arata, L., Kraut, A., Navratil, V., Bouvet, P., and Greco, A. (2016) Nuclear functions of nucleolin through global proteomics and interactomic approaches. *J Proteome Res* **15**: 1659–1669.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., and Eliceiri, K. W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* **9**: 671–675.
- Schwalb, C., Chapman, S., and Reid, G. (2002) The membrane-bound tetrahaem c-type cytochrome CymA interacts directly with the soluble fumarate reductase in *Shewanella*.
- Schwalb, C., Chapman, S. K., and Reid, G. A. (2003) The tetraheme cytochrome CymA is required for anaerobic respiration with dimethyl sulfoxide and nitrite in *Shewanella oneidensis*. *Biochemistry* **42**: 9491–9497.
- Scott, J. R., and Barnett, T. C. (2006) Surface proteins of Gram-positive bacteria and how they get there. *Annu Rev Microbiol* **60**: 397–423.
- Sekar, R., Shin, H. D., and DiChristina, T. J. (2016) Activation of an otherwise silent xylose metabolic pathway in *Shewanella oneidensis*. *Appl Environ Microbiol* **82**: 3996–4005.
- Seviour, T., Derlon, N., Dueholm, M. S., Flemming, H.-C., Girbal-Neuhauser, E., Horn, H., Kjelleberg, S., van Loosdrecht, M. C. M., Lotti, T., Malpei, M. F., Nerenberg, R., Neu, T. R., Paul, E., Yu, H., and Lin, Y. (2019) Extracellular polymeric substances of biofilms: Suffering from an identity crisis. *Water Res* **151**: 1–7.
- Sheidy, D. T., and Zielke, R.A. (2013) Analysis and expansion of the role of the *Escherichia coli* protein ProQ. *PLoS One* **8**: e79656.
- Shi, L., Chen, B., Wang, Z., Elias, D. A., Mayer, M. U., Gorby, Y. A., Ni, S., Lower, B. H., Kennedy, D. W., Wunschel, D. S., Mottaz, H. M., Marshall, M. J., Hill, E. A., Beliaev, A. S., Zachara, J. M., Fredrickson, J. K., and Squier, T. C. (2006) Isolation of a high-affinity

functional protein complex between OmcA and MtrC: Two outer membrane decaheme c-type cytochromes of *Shewanella oneidensis* MR-1. *J Bacteriol* **188**: 4705–4714.

Shi, Z., Wang, Q., Li, Y., Liang, Z., Xu, L., Zhou, J., Cui, Z., and Zhang, L. H. (2019) Putrescine is an intraspecies and interkingdom cell-cell communication signal modulating the virulence of *Dickeya zeae*. *Front Microbiol* **10**: 1950.

Silva, A. V., Edel, M., Gescher, J., and Paquete, C. M. (2020) Exploring the effects of *bolA* in biofilm formation and current generation by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Front Microbiol* **11**: 815.

Staudt, C., Horn, H., Hempel, D. C., and Neu, T. R. (2004) Volumetric measurements of bacterial cells and extracellular polymeric substance glycoconjugates in biofilms. *Biotechnol Bioeng* **88**: 585–592.

Streisinger, G., Okada, Y., Emrich, J., Newton, J., Tsugita, A., Terzaghi, E., and Inouye, M. (1966) Frameshift mutations and the genetic code. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **31**: 77–84.

Sturm, G., Richter, K., Doetsch, A., Heide, H., Louro, R. O., and Gescher, J. (2015) A dynamic periplasmic electron transfer network enables respiratory flexibility beyond a thermodynamic regulatory regime. *ISME J* **9**: 1802–1811.

Sun, D., Chen, J., Huang, H., Liu, W., Ye, Y., and Cheng, S. (2016) The effect of biofilm thickness on electrochemical activity of *Geobacter sulfurreducens*. *Int J Hydrogen Energy* **41**: 16523–16528.

Sure, S., Ackland, M. L., Torriero, A. A. J., Adholeya, A., and Kochar, M. (2016) Microbial nanowires: an electrifying tale. *Microbiology* **162**: 2017–2028.

Suresh, A. K., Pelletier, D. A., Wang, W., Moon, J. W., Gu, B., Mortensen, N. P., Allison, D. P., Joy, D. C., Phelps, T. J., Doktycz, M. J. (2010) Silver nanocrystallites: Biofabrication using *Shewanella oneidensis*, and an evaluation of their comparative toxicity on gram-negative and gram-positive bacteria. *Environ Sci Technol* **44**: 5210–5215.

Suzuki, K., Wang, X., Weilbacher, T., Pernestig, A. K., Melefors, Ö., Georgellis, D., Babitzke, P., Romeo, T. (2002) Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**: 5130–5140.

Sydow, A., Krieg, T., Mayer, F., Schrader, J., and Holtmann, D. (2014) Electroactive bacteria—molecular mechanisms and genetic tools. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**: 8481–8495.

Tajima, N., Kouzuma, A., Hashimoto, K., and Watanabe, K. (2011) Selection of *Shewanella oneidensis* MR-1 gene-knockout mutants that Adapt to an electrode-respiring condition. *Biosci Biotechnol Biochem* **75**: 110539–110540.

Textor, S., Wendisch, V. F., Graaf, A.A. De, Müller, U., Linder, M. I., Linder, D., and Buckel, W. (1997) Propionate oxidation in *Escherichia coli*: Evidence for operation of a methylcitrate cycle in bacteria. *Arch Microbiol* **168**: 428–436.

The UniProt Consortium (2021). UniProt: The universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res*, 49(1), 480–489.

Thirumurthy, M. A., and Jones, A. K. (2020) Geobacter cytochrome OmcZs binds riboflavin: implications for extracellular electron transfer. *Nanotechnology* **31**: 124001.

Tsang, A. W., Horswill, A. R., and Escalante-Semerena, J. C. (1998) Studies of regulation of expression of the propionate (*prpBCDE*) operon provide insights into how *Salmonella typhimurium* LT2 integrates its 1,2- propanediol and propionate catabolic pathways. *J Bacteriol* **180**: 6511–6518.

Velasquez-Orta, S. B., Head, I. M., Curtis, T. P., Scott, K., Lloyd, J. R., and von Canstein, H. (2010) The effect of flavin electron shuttles in microbial fuel cells current production. *Appl Microbiol Biotechnol* **85**: 1373–1381.

Venkateswaran, K., Moser, D. P., Dollhopf, M. E., Lies, D. P., Saffarini, D. A., MacGregor, B. J., *et al.* (1999) Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **49**: 705–724.

Vera, M., Krok, B., Bellenberg, S., Sand, W., and Poetsch, A. (2013) Shotgun proteomics study of early biofilm formation process of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 on pyrite. *Proteomics* **13**: 1133–1144.

Wagner, M. and Horn, H. (2017) Optical coherence tomography in biofilm research: A comprehensive review. *Biotechnol Bioeng* **114**: 1386–1402.

Wang, Y., Kern, S. E., and Newman, D. K. (2010) Endogenous phenazine antibiotics promote anaerobic survival of *Pseudomonas aeruginosa* via extracellular electron transfer. *J Bacteriol*

**192**: 365–9.

Wendoloski, J. J., Matthew, J. B., Weber, P. C., and Salemme, F. R. (1987) Molecular dynamics of a cytochrome c-cytochrome b5 electron transfer complex. *Science* **238**: 794–797.

Werpy, T., and Petersen, G. (2004) Top value added chemicals from biomass. *US Dep energy* **1**: 76.

Wieczorek, S., Combes, F., Lazar, C., Gai Gianetto, Q., Gatto, L., Dorffer, A., Hesse, A.-M., Coute, Y., Ferro, M., Bruley, C., and Burger, T. (2016) DAPAR & ProStaR: software to perform statistical analyses in quantitative discovery proteomics. *Bioinformatics* **33**: 135–136.

Wingender, J., Neu, T. R., and Flemming, H.-C. (1999) What are bacterial extracellular polymeric substances? In *Microbial Extracellular Polymeric Substances*. Springer, Berlin. pp. 1–19.

Xiao, X., Ma, X. L., Wang, L. G., Long, F., Li, T. T., Zhou, X. T., Liu, H., Wu, L.-J., and Yu, H.-Q. (2021) Anaerobic reduction of high-polarity nitroaromatic compounds by electrochemically active bacteria: Roles of Mtr respiratory pathway, molecular polarity, mediator and membrane permeability. *Environ Pollut* **268**: 115943.

Xu, S., Jangir, Y., and El-Naggar, M. Y. (2016) Disentangling the roles of free and cytochrome-bound flavins in extracellular electron transport from *Shewanella oneidensis* MR-1. *Electrochim Acta* **198**: 49–55.

Yang, T., Rao, Z., Zhang, X., Xu, M., Xu, Z., and Yang, S. T. (2017) Metabolic engineering strategies for acetoin and 2,3-butanediol production: advances and prospects. *Crit Rev Biotechnol* **37**: 990–1005.

Zehr, B. D., Savin, T. J., and Hall, R. E. (1989) A one-step, low background Coomassie staining procedure for polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **182**: 157–159.

Zhu, F., San, K. Y., and Bennett, G. N. (2020) Metabolic engineering of *Escherichia coli* for malate production with a temperature sensitive malate dehydrogenase. *Biochem Eng J* **164**.

Zhu, G., Yang, Y., Liu, J., Liu, F., Lu, A., and He, W. (2017) Enhanced photocurrent production by the synergy of hematite nanowire-arrayed photoanode and bioengineered *Shewanella oneidensis* MR-1. *Biosens Bioelectron* **94**: 227–234.

Zhu, J., Huang, X., Zhang, F., Feng, L., and Li, J. (2015) Inhibition of quorum sensing, biofilm,

## Literatur

and spoilage potential in *Shewanella baltica* by green tea polyphenols. *J Microbiol* **53**: 829–836.

## Danksagung

### Danksagung

Lieber Johannes, ich möchte dir von ganzem Herzen dafür danken, dass du mich schon so früh mit deiner Begeisterung für die Mikrobiologie angesteckt hast, dass du mir immer das Gefühl gegeben hast, alles erreichen zu können, was ich mir wünsche und alles getan hast, um mich dabei zu unterstützen. Es ist unglaublich schön, ein Teil deiner Arbeitsgruppe zu sein und ich finde es bemerkenswert, wie viel Zeit du dir immer für all die großen und kleinen Probleme nimmst. Ich möchte dir dafür danken, dass du mit deinen Ideen und deinem Optimismus in schwierigen Zeiten immer zur Stelle warst und nie den Glauben verloren hast. Durch einen Chef wie dich ist es ein Leichtes, mit Freude zur Arbeit zu kommen und alles zu geben.

Liebe AG Gescher, ich kann mir keine angenehmere, hilfsbereitere, kompetentere und herzlichere Gruppe zum gemeinsamen Arbeiten vorstellen. Es ist jeden Tag eine Freude ins Labor zu kommen und jedes Mal ein Abenteuer, das man erlebt, bis man nach Hause geht. Ich danke euch für die wundervolle, witzige und entspannte Arbeitsatmosphäre, die einen die Zeit nur allzu oft vergessen lässt. Zudem danke ich euch für die Unterstützung in den letzten Wochen und Monaten und eure Rücksicht auf meinen wachsenden Bauch. Ich hoffe noch einige Jahre mit euch verbringen zu können und freue mich darauf, was die Jahre für uns alle bringen. Danke auch an die Gemüsefrauen für die schönen Mittagspausen, dafür dass immer alles geteilt wurde und keiner hungrig zurück zur Arbeit musste und dafür, dass immer ein offenes Ohr für Nörgeleien und Frust war. Danke Laura, dafür dass du es schon so lange mit mir im Labor aushältst und immer noch nicht zu viel hast. Ich freue mich, noch ein paar Jahre obendrauf zu packen. Danke Edi für deine Hilfe und Geduld bei meinen Chipexperimenten, das gemeinsame Bier trinken, wenn der Frust groß war, und die Samstagfrühstücke nach dem Markt. Danke Jonas für deine last-minute Hilfe bei der Auswertung der Bioinformatik und dafür, dass du immer erreichbar und bereit warst, dein Möglichstes zu tun um zu helfen. Ihr alle habt mir unglaublich viel Kraft und Motivation gegeben in den letzten Jahren.

Liebe Anna-Lena, danke, dass du auch diesmal wieder die Zeit gefunden hast, dich mit meinem Satzbau auseinanderzusetzen und Kommata zu sortieren. Danke für deine langjährige Freundschaft und deine positive Bestärkung, wenn die Selbstzweifel doch mal wieder größer werden als der Mut.

Lieber Jonas, danke, dass du immer für mich da bist, dass du mich an schlechten Tagen auffängst und mich wieder aufbaust. Danke, dass du für mich zum Lachen und auf andere Gedanken bringst und auch für dein unendliches Verständnis, wenn es mal wieder spät wurde oder das Wochenende verplant war. Danke auch, dass du mit mir diesen aufregenden Schritt in Richtung Familie gehst und so stark an meiner Seite stehst.

## Danksagung

Liebe Mama, lieber Papa, danke dass ihr das alles erst möglich gemacht habt, dass ihr mich immer unterstützt habt und für mich da wart, wenn ich euch gebraucht habe. Danke für euer Verständnis, wenn mal wieder viel zu tun und wenig Zeit war und eure Gelassenheit, wenn ihr mal wieder ein paar Monate nichts von mir gehört habt.

## **Beruflicher und wissenschaftlicher Werdegang**

Miriam Edel

### Ausbildung

- Seit 04/2018: Doktorandin am Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Angewandte Biologie; Karlsruher Institut für Technologie (KIT)  
angestrebter Abschluss: Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
Schwerpunkt: Mikrobiologie, Molekularbiologie, bioelektrochemische Systeme  
Thema der Arbeit: Verbesserung der Produktivität von *Shewanella oneidensis* in bioelektrochemischen Systemen durch erhöhte Biofilmbildung
- 10/2015 – 03/2018: M. Sc. in Biologie (1,2), Karlsruher Institut für Technologie (KIT)  
Schwerpunkt: Mikrobiologie, Molekularbiologie, chemische Biologie  
Masterarbeit: Erweiterung der Anwendungsmöglichkeiten der Elektrodeninteraktion von *Shewanella oneidensis*
- 10/2012 – 08/2015: B. Sc. in Angewandter Biologie (1,8), Karlsruher Institut für Technologie (KIT)  
Bachelorarbeit: Nicht-stöchiometrische Fermentation in *Escherichia coli*
- 09/2003 – 07/2011: Abitur (2,0), Justus-Knecht-Gymnasium Bruchsal