

# **Implementierung des elektroaktiven Deltaproteobakteriums *Desulfuromonas acetexigens* in mikrobiellen Elektrolysezellen**

Masterarbeit

cand. M. Sc. Max Rümenapf

Engler-Bunte-Institut  
Wasserchemie und Wassertechnologie  
KIT Campus Süd

Karlsruhe, 04. Juni 2024

Gutachter:

Prof. Dr. Harald Horn  
Prof. Dr. Christof Niemeyer



# **Erklärung an Eides statt**

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken als solche kenntlich gemacht habe.

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass die vorliegende Arbeit zu wissenschaftlichen Zwecken ausgeliehen, vervielfältigt und in die Bibliothek des Engler-Bunte-Instituts, Wasserchemie und Wassertechnologie eingestellt werden darf.

---

Ort, Datum

---

Max Rümenapf

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>III</b>
<b>Abkürzungen .....</b>	<b>IV</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung und Zielsetzung.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Theoretische Grundlagen.....</b>	<b>3</b>
2.1 Bioelektrochemische Systeme (BES) .....	3
2.2 Biofilme .....	6
2.3 <i>Geobacter sulfurreducens</i> .....	9
2.4. <i>Desulfuromonas acetexigens</i> .....	10
2.4.1 Aktuelle Anwendungsbereiche von <i>Desulfuromonas acetexigens</i> .....	11
<b>3 Material und Methoden.....</b>	<b>12</b>
3.1 Bakterienstämme .....	12
3.2 Medien .....	12
3.3 Kultivierung von Bakterienstämmen.....	15
3.3.1 Konservierung von Bakterienstämmen .....	16
3.4 Phylogenetische Charakterisierung .....	17
3.5 Elektrochemische Methoden .....	18
3.5.1 Chronoamperometrie .....	18
3.5.2 Aufbau der Fließzellenperipherie .....	19
3.6 Analytische Methoden .....	22
3.6.1 Ionenaustauschchromatographie .....	22
3.6.2 Gaschromatographie.....	22
3.6.3 Zellquantifizierung .....	22
3.7 Charakterisierung des Biofilms .....	23
3. 7. 1 Optische Kohärenz-Tomographie (OCT).....	23
<b>4 Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>26</b>
4.1 Wachstumsverhalten von <i>D. acetexigens</i> .....	26
4.2 Bioelektrochemische Kultivierungen .....	29
4.2.1 Bioelektrochemische Kultivierung von <i>D. acetexigens</i> .....	30
4.2.2 Charakterisierung der Biofilmmorphologie von <i>D. acetexigens</i> und deren Einfluss auf die erzeugte Stromdichte .....	40

4.2.3 Bioelektrochemische Kultivierung und morphologische Analyse von <i>Geobacter sulfurreducens</i> .....	45
3.2.4 Vergleich des extrazellulären Elektronentransfers von <i>D. acetexigens</i> und <i>G. sulfurreducens</i> ...	48
4.2.5 Analyse der Biofilmmorphologie über die laterale Ausdehnung der Anode .....	48
4.3. OCT-Visualisierungsroutinen der Biofilmmorphologie auf der Anode. ....	56
4.4 Analyse der Acetatproduktion und phylogenetische Klassifizierung der mikrobiellen Konsortien ...	61
<b>5 Schlussfolgerung</b> .....	<b>76</b>
<b>6 Referenzen</b> .....	<b>78</b>
<b>Anhang</b> .....	<b>89</b>
Abbildungen im Anhang.....	89
Tabellen im Anhang .....	95
Genutzte Makros.....	98
Danksagung .....	114

# Zusammenfassung

Angesichts der begrenzten Verfügbarkeit fossiler Rohstoffe und des wachsenden globalen Energiebedarfs fokussiert sich die Biotechnologie verstärkt auf alternative Energie- und Kohlenstoffquellen. Wasserstoff, mit seiner hohen Energiedichte, wird als ein vielversprechendes Produkt mikrobieller Elektrolysezellen betrachtet, um als Energiespeicher zu dienen. Diese Studie zielt darauf ab, den elektroaktiven Desulfurikanten *Desulfuromonas acetexigens* in mikrobiellen Elektrolysezellen (MECs) im Labormaßstab zu implementieren. *D. acetexigens*, ein Bakterium, das aufgrund seiner Unfähigkeit, Wasserstoff als Elektronendonator zu nutzen, als vielversprechender Kandidat für die Umwandlung von chemischer in elektrische Energie betrachtet wird, katalysiert eine anodische Respiration in MECs, verbunden mit hohen Wasserstoffproduktionsraten an der Kathode. Die Biofilmmorphologie von *D. acetexigens* wurde mittels optischer Kohärenztomographie (OCT) charakterisiert und sein elektrochemisches Verhalten mit dem von *Geobacter sulfurreducens* verglichen. Durch phylogenetische Analysen wurden die in einzelnen Kultivierungen vorhandenen mikrobiellen Konsortien taxonomisch klassifiziert. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass trotz der starken Abundanz von homoacetogenen- und clostridialen Kontaminanten die Stromdichte ausschließlich auf den extrazellulären Elektronentransfer der zugegebenen elektroaktiven Bakterien zurückzuführen ist, was auf eine Nischendominanz dieser Zielorganismen hinweist. Des Weiteren blieb *D. acetexigens*, trotz der in dieser Arbeit postulierten syntrophen Ethanolvergärung, der Organismus mit der höchsten relativen Abundanz im anodischen Biofilm der MECs. Der Nachweis einer Coulomb'schen Effizienz von  $0,96 \pm 0,03$  in einer monokulturell mit *D. acetexigens* betriebenen MEC belegt, dass Wasserstoff nicht durch diesen Organismus oxidiert werden kann. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erbrachten Erkenntnisse bestätigen, dass *D. acetexigens* als Biokatalysator für einen effizienten mikrobiellen Elektrolyseprozess geeignet ist.

# Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
BES	Bioelektrochemische Systeme
$e^-$	Elektron
$E^{0'}$	Standard-Redoxpotential
EAB	Elektroaktiv Biofilm
EAM	Elektroaktive Mikroorganismen
EPS	Extrazelluläre Polymere Substanzen
EtOH	Ethanol
MEC	<i>Microbial Electrolysis Cell</i>
MFC	<i>Microbial Fuel Cell</i>
OCT	<i>Optical Coherence Tomography</i>
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei der Wellenlänge 600 nm
SHE	<i>Standard Hydrogen Electrode</i>
VFA	<i>Volatile Fatty Acid</i>
% (v/v)	Volumenprozent

---

# Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematischer Aufbau der verschiedenen bioelektrochemischen Systeme.....	4
Abb. 2: Aktuelles Modell der Biofilmbildung (abgewandelt nach Sauer <i>et al.</i> , 2022). .....	7
Abb. 3: Schematische Darstellung von Stoffaustausch und Elektronentransport eines heterotrophen, elektrochemisch aktiven Biofilms. ....	8
Abb. 4: Darstellung der verwendeten Fließzellenperipherie. ....	20
Abb. 5: Strömungsfeld im Inneren der Fließzelle mit einem Geschwindigkeitsgefälle von links nach rechts. ....	21
Abb. 6: Wachstumskurve von <i>D. acetexigens</i> in planktonischer Flüssigzellkultur in anaerobisiertem BES-Medium.....	27
Abb. 7: Korrelation zwischen Lebend- und Gesamtzellzahl, gemessen mit Durchflusszytometrie, und der mit dem Photometer gemessenen optischen Dichte von <i>D. acetexigens</i> ( $OD_{600}$ ). ....	28
Abb. 8: Bioelektrochemische Kultivierung Des1 von <i>D. acetexigens</i> bei unterschiedlichen angelegten Potentialen. ....	31
Abb. 9: Bioelektrochemische Kultivierung von <i>D. acetexigens</i> mit einer Start- $OD_{600}$ von 0,15 bei einem anodischen Potential von 0 mV vs. SHE. ....	35
Abb. 10: Bioelektrochemische Kultivierung von <i>D. acetexigens</i> mit einer Start- $OD_{600}$ von 0,35 bei einem anodischen Potential von 0 mV vs. SHE. ....	37
Abb. 11: Höhenprofile (8 x 6 mm; B x L) der anodisch akkumulierten Biomasse um die Zeit der pH-Wertanpassung in Des3B.....	38
Abb. 12: Vergleich des spezifischen Biofilmvolumens der <i>D. acetexigens</i> Des3B-Kultivierung an unterschiedlichen Positionen des Substratums. ....	39
Abb. 13: Darstellung der mittleren gemessenen Parameter der Biofilmmorphologie und Stromdichte der Duplikate Des2 $\overline{AB}$ und Des3 $\overline{AB}$ von <i>D. acetexigens</i> bei einem angelegten Potential von 0 mV vs. SHE. ....	40
Abb. 14: Korrelation zwischen den gemittelten Biofilmvolumina der Anodenposition A, B und C, der Biofilmakkumulationsraten, den mittleren Bedeckungsgraden des Substratums und den Stromdichten der Kultivierungen Des2A und Des3 $\overline{AB}$ . ....	44
Abb. 15: Bioelektrochemische Analysen von <i>G. sulfurreducens</i> , bei einem Potential von 0 mV vs. SHE an der Anode.....	46

Abb. 16: Darstellung der mittleren gemessenen Parameter der Biofilmmorphologie und Stromdichte der bioelektrochemischen Kultivierung Geo1 $\overline{AB}$ von <i>G. sulfurreducens</i> bei einem angelegten Potential von 0 mV vs. SHE. ....	47
Abb. 17: Darstellung des Höhenprofilverlaufs von <i>D. acetexigens</i> mit <i>G. sulfurreducens</i> , über die Breite der Anode, 6 Tage nach Repolarisation der Anode. ....	50
Abb. 18: Darstellung des Höhenprofilverlaufs von <i>D. acetexigens</i> mit <i>G. sulfurreducens</i> , über die Breite der Anode, 10 Tage nach Repolarisation der Anode. ....	51
Abb. 19: Darstellung des gemittelten Höhenprofilverlaufs des <i>D. acetexigens</i> Biofilms, der Höhenprofile und der laminaren Strömungsbedingungen über die Breite der Anode. ....	54
Abb. 20: Darstellung des gemittelten Höhenprofilverlaufs des <i>G. sulfurreducens</i> Biofilms, der Höhenprofile und der laminaren Strömungsbedingungen über die Breite der Anode. ....	55
Abb. 21: Bemaßung der in diesem Projekt visualisierten Flächen auf der Anode in mm. ....	57
Abb. 22: Aus jeweils 11 OCT-Datensätzen zusammengefügte Höhenprofile über die gesamte Länge der Anode an den Tagen 6, 8 und 11 der Kultivierung Des2A von <i>D. acetexigens</i> . ....	58
Abb. 23: Vergleich des gemittelten Biofilmvolumens der Positionen A, B und C (schwarz) sowie des mittleren Biofilmvolumens der gesamten Länge der Anode (grau). ....	59
Abb. 24: Vergleich des mittleren Biovolumens von <i>D. acetexigens</i> der Positionen A, B und C mit einer Aufnahmehöhe von 8 mm (grau) sowie des mittleren Biovolumens mit einer Aufnahmehöhe von 16 mm (rot). ....	60
Abb. 25: Darstellung der VFA-Konzentrationen aller Duplikat-Kultivierungen. ....	61
Abb. 26: Taxonomische Klassifikation der 16s-Amplikon Sequenzierung der <i>D. acetexigens</i> Kultivierung Des3B. ....	65
Abb. 27: Taxonomische Klassifikation der 16s-Amplikon Sequenzierung der <i>G. sulfurreducens</i> Kultivierung Geo1B. ....	65
Abb. 28: Schematische Darstellung der syntrophen EtOH-Vergärung zwischen <i>Sporomusa sphaeroides</i> 2875 und elektroaktiven, Acetat zu CO <sub>2</sub> oxidierenden Mikroorganismen (EAM). ....	70
Abb. 29: Experiment zum Nachweis der Ethanol-Vergärung in den Kultivierungen Des3B und Geo1B. ....	72
Abb. 30: Kultivierung von <i>D. acetexigens</i> (Des4): Negativkontrolle ohne Ethanoleintrag. ....	74

# Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete Bakterienstämme.....	12
Tab. 2: Zusammensetzung des BES-Anzuchtmediums für <i>Geobacter sulfurreducens</i> und <i>Desulfuromonas acetexigens</i> nach Knoll <i>et al.</i> , 2022. .....	13
Tab. 3: Zusammensetzung der Wolins Vitaminlösung (100x) des Minimalmediums MM141 der DSMZ..	13
Tab. 4: Zusammensetzung der Geobacter-NB-Spurenelementlösung (100x) (Hackbarth <i>et al.</i> , 2023). .....	14
Tab. 5: Zusammensetzung der Selenit-Wolframatlösung nach dem Minimalmedium MM385 der DSMZ.	14
Tab. 6: Zusammensetzung des veränderten MEC-Mediums nach Sapireddy <i>et al.</i> , 2021. .....	15
Tab. 7: Zusammensetzung der Salzlösung zur Resuspension von zuvor zentrifugierten Bakterien. ....	16
Tab. 8: Zusammensetzung unterschiedlicher pH-Puffer. .....	16
Tab. 9: Darstellung des Sequenzierten Probenmaterials.....	17
Tab. 10: Inokulierte Lebendzellzahl und optische Dichte ( $OD_{600}$ ), anodisch angelegtes Potential und maximale Stromdichte ( $J_{max}$ ) bioelektrochemischer Kultivierungen von <i>D. acetexigens</i> . ....	29
Tab. 11: Übersicht über die in diesem Projekt durchgeführten bioelektrochemischen Kultivierungen in der Fließzelle als mikrobielle Elektrolysezelle.....	30
Tab. 12: Präsentation der Biofilmparameter von Des2A und Des3 $\overline{AB}$ zum Zeitpunkt der maximalen Stromdichte sowie des Inflektionspunktes. ....	45
Tab. 13: Mittlere Biofilmdicke von <i>D. acetexigens</i> und <i>G. sulfurreducens</i> an unterschiedlichen OCT-Aufnahmepositionen. ....	52
Tab. 14: Darstellung der mittels IC nachgewiesenen Substrat-, und Fettsäurekonzentrationen $C_{Sub, t0}$ , $C_{VFA, tE}$ , der theoretisch umgesetzten Acetatkonzentrationen $\Delta C_{AC, Umsatz}$ , der verbrauchten netto Acetatkonzentrationen zum Ende der Kultivierungen ( $C_{Ac, erwartet, tE}$ ) und der jeweils produzierten flüchtigen Fettsäuren ( $C_{VFA, prod}$ ) (Ac.: Acetat, Prop.: Propionat, But.: Butyrat, Val.: Valeriansäure) der Duplikat Kultivierungen Des2AB, Des3AB und Geo1AB.....	63

# 1 Einleitung und Zielsetzung

Erdöl, Erdgas und Kohle haben derzeit immer noch einen Anteil von ca. 80 Prozent an der globalen Gesamtenergieversorgung (Thielges, 2023). Die Notwendigkeit, von fossilen Energien auf kohlenstoffneutrale Quellen umzusteigen, ist zwar allgemein anerkannt, doch wie dieser Übergang konkret und in dem erforderlichen Umfang realisiert werden kann, ist derzeit noch nicht eindeutig definiert (Rousseau *et al.*, 2020). Eine naheliegende Möglichkeit besteht in der Umstellung auf erneuerbare Energien (Bundesministerium für Wirtschaft und Klimaschutz (BMWK), 2023). Die Nutzung von Energiequellen wie Wind, Sonnenlicht oder Wasserkraft zur Stromerzeugung ist hierbei sehr attraktiv und deckte 2023 in Deutschland ca. 52 % (272,4 Mrd. kWh) des gesamten Bruttostromverbrauches (526 Mrd. kWh) (BMWK, 2024). Um die fluktuierende Verfügbarkeit dieser Energiequellen erfolgreich nutzen zu können, sind allerdings effiziente Speichermethoden erforderlich, um die zeitlichen Schwankungen auszugleichen (Fekete *et al.*, 2023). Die Konversion elektrischer Energie in chemische Energie in Form einer Wasserstoffproduktion durch Wasserelektrolyse könnte eine zukunftsorientierte Möglichkeit der Energiespeicherung bieten (Xu *et al.*, 2024).

Obwohl aktuell verschiedene Arten von Wasserelektrolysetechnologien existieren, müssen Fortschritte erzielt werden, um diese in groß angelegte und wirtschaftlich effiziente Energienetze zu integrieren (Carmo *et al.*, 2013). Insbesondere sollten Elektrokatalysatoren verbessert und ihre Kosten gesenkt werden (Ursua *et al.*, 2012). In diesem Zusammenhang wird die mikrobielle Elektrolyse als vielversprechender Ansatz betrachtet (Nevin *et al.*, 2010). An der Anode katalysiert ein elektroaktiver Biofilm aus dazu befähigten Mikroorganismen die direkte Umwandlung chemischer Energie in elektrische Energie. An der Kathodenseite können die erzeugten Elektronen zur Reduktion von Protonen zu Wasserstoff genutzt werden (Katuri *et al.*, 2020; Sapireddy *et al.*, 2021; Elreedy *et al.*, 2024). Im Vergleich zu klassischen Verfahren wie der abiotischen Wasserelektrolyse hat dieser Prozess den Vorteil, dass die Anode aus kostengünstigen Materialien bestehen kann, da die Generierung von Elektronen auf der Anodenseite enzymatisch durch die Mikroorganismen katalysiert wird. Darüber hinaus wird der Energieaufwand an der Kathode erheblich reduziert, da die Elektronen bereits auf einem niedrigen Redoxpotential durch den mikrobiellen Metabolismus bereitgestellt werden, was die notwendige Energie für die Wasserstoffproduktion verringert (Zhang & Angelidaki, 2014).

Um in mikrobiellen Elektrolysezellen (MECs) hohe Stromdichten mit hoher Wasserstoffausbeute zu erzielen, müssen die bestehenden Systeme optimiert werden (Hackbarth *et al.*, 2023). Neben der Verbesserung des Reaktordesigns oder der Anodenmaterialien kann auch die Implementierung neuer Mikroorganismen als Biokatalysatoren zu höheren Leistungen führen (Katuri *et al.*, 2013).

Das Ziel dieser Masterarbeit ist die umfassende Untersuchung des bioelektrochemischen Verhaltens sowie der sich entwickelnden Biofilmmorphologie des elektroaktiven Deltaproteobakteriums *Desulfuromonas acetexigens* in MECs. Die Versuche werden im Labormaßstab in Fließzellen durchgeführt. Dabei sollen die Kultivierungen auch mit denen des elektroaktiven Modellorganismus *Geobacter sulfurreducens* verglichen werden.

Der Organismus *D. acetexigens* wurde ausgewählt, um zu untersuchen, ob er aufgrund seiner Unfähigkeit, Wasserstoff als Elektronendonator zu nutzen und damit das gewünschte Produkt – zumindest teilweise – wieder zu verbrauchen, als vielversprechender Kandidat für die Nutzung in mikrobiellen Elektrolysesystemen in Frage kommt.

# 2 Theoretische Grundlagen

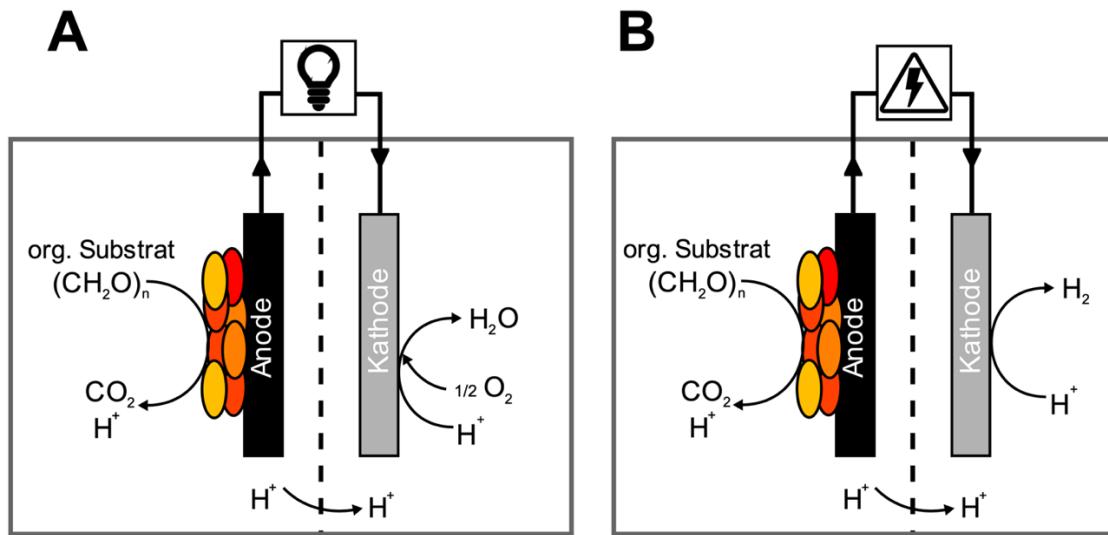
## 2.1 Bioelektrochemische Systeme (BES)

Die Verknüpfung biologischer und elektrochemischer Prozesse wird unter dem Begriff Bioelektrochemie oder Bioelektrokatalyse zusammengefasst. Ein großes Anwendungsfeld ist die mikrobielle-Elektrochemie, welche die Interaktion zwischen Mikroorganismen und Elektronenleitern beschreibt. Bei diesen Elektronenleitern kann es sich um natürlich vorkommende, leitfähige Verbindungen, wie beispielweise Metalloxide, oder um Metall- oder Kohlenstoffelektroden handeln (Nealson & Saffarini, 1994; Tender *et al.*, 2002; Friedman *et al.*, 2013). Eine Übertragung von Elektronen zwischen Mikroorganismus und Elektronenleiter kann dabei in beide Richtungen erfolgen (Richter *et al.*, 2012; Ilbert & Bonnefoy, 2013; Wang & Ren, 2013). Solche zum externen Elektronentransfer befähigte Mikroorganismen werden exoelektrogene Mikroorganismen (engl. **electroactive microorganisms**; EAM) genannt (Logan, 2009).

Für die Nutzung der mikrobiellen Elektrochemie sind bioelektrochemische Systeme (BES) entscheidend. BES umfassen eine Technologiegruppe, welche die im Substrat enthaltene Energie in eine direkte Stromgeneration oder in speicherbare Energieträger wie z. B. Wasserstoff umwandeln können (Logan & Rabaey, 2012; Rabaey *et al.*, 2007; Schröder, *et al.*, 2015). Da der aktuelle Trend in der biologischen Abwasserreinigung in die Richtung der Rückgewinnung von Ressourcen (z. B. wiedergewonnenes Wasser, Energie, Nährstoffe etc.) geht, sind BES in den letzten Jahren in das Zentrum vieler Studien zur Abwasseraufbereitung gerückt. Dass BES bei der Behandlung von Abwässern ein hohes Potential der Energiegewinnung und Abwasseraufbereitung zeigen, wurde 2018 im Kubikmetermaßstab nachgewiesen. Hierbei konnte eine maximale Energiedichte von  $125 \text{ W m}^{-3}$  aus künstlichem-, und  $6 \text{ W m}^{-3}$  aus kommunalem Abwasser generiert werden. Eine Energierückgewinnung von ca.  $0,033 \text{ kWh}$  pro  $\text{m}^3$  kommunalem Abwasser wurde erreicht (Liang *et al.*, 2018). Der in dieser Publikation genutzte Reaktor wird als **mikrobielle Brennstoffzelle** (engl. **microbial fuel cell**; MFC) definiert. Der Betrieb einer MFC mit dem Substrat Abwasser bietet einen doppelten Nutzen in Form der Gewinnung von elektrischer Energie und der nachhaltigen Abwasserbehandlung. Somit beschreiben MFC-Systeme die Erzeugung elektrischer Energie, resultierend aus der mikrobiellen Oxidation organischer Verbindungen (Potter, 1911; Nevin *et al.*, 2010; Rosenbaum & Franks, 2014; Edel *et al.*, 2022). Hierbei wird eine Anode als terminaler Elektronenakzeptor genutzt, wobei die Elektronen durch die Überwindung eines externen elektrischen Verbrauchers zur Kathode gelangen, an der wiederum Elektronenakzeptoren wie Sauerstoff, Nitrat oder Sulfat reduziert werden (Logan & Regan, 2006).

In Abbildung 1 ist ein schematischer Aufbau verschiedener bioelektrochemischer Systeme dargestellt. Die Abb. 1A zeigt das Funktionsprinzip einer Zwei-Kammer MFC: ein anaerobes Anodenkompartiment und eine aerobes Kathodenkompartiment, in dem die Protonen mit den Elektronen und Sauerstoff zu

Wasser reagieren (Logan & Regan, 2006). Damit Sauerstoff nicht mit der Anode als Elektronenakzeptor konkurriert, und um eine Sauerstoffvergiftung der meist anaeroben exoelektrogenen Mikroorganismen zu vermeiden, wird durch eine Protonenaustauschmembran (Abb. 1A; gestrichelte Linie) eine Sauerstoffinvasion in das Anodenkompartiment unterbunden (Rahimnejad *et al.*, 2015).



**Abb. 1: Schematischer Aufbau der verschiedenen bioelektrochemischen Systeme.** Gezeigt ist eine mikrobielle Brennstoffzelle (A) und eine mikrobielle Elektrolysezelle (B). Diese Abbildung wurde der Dissertation von Daniel Härrer entnommen (Härrer, 2021).

Einer der sich rasch entwickelnden Bereiche für die Umwandlung der organischen Bestandteile von Abwasser in Chemikalien oder Kraftstoffe basiert auf dem Einsatz einer **mikrobiellen Elektrolysezelle** (engl. *microbial electrolysis cell; MEC*) (Logan & Rabaey, 2012; Wang & Ren, 2013). Die MEC (vgl. Abb. 1B) ermöglicht somit im Gegensatz zur MFC eine Speicherung der in den Abfallstoffen enthaltenen Energie in chemischer Form und nicht die direkte Freisetzung der elektrischen Energie. Analog zur MFC werden auch hier Elektronen durch einen mikrobiellen Oxidationsprozess des Substrates bereitgestellt. Die Elektronen werden an die Elektrode weitergeleitet, und die bei der Oxidation zeitgleich erzeugten Protonen werden durch den Elektrolyten transportiert. An der Kathode können die Protonen durch die aus dem externen Kreislauf zugeführten Elektronen zu Wasserstoff (als Kraftstoff) reduziert werden (vgl. Abb. 1B). Diese Reaktion läuft nicht spontan ab, weshalb zusätzlich eine Spannung angelegt werden muss (Das, 2018). Bei neutralem pH-Wert und Acetat als Substrat erzeugen die Mikroorganismen an der Anode ein Arbeitspotential von etwa -0,3 V gegen eine Standard-Wasserstoff-Elektrode (engl. *standard hydrogen electrode, SHE*). An der Kathode ist für die Wasserstoffproduktion ein Potential von -0,414 V (vs. SHE) erforderlich. Theoretisch entsteht somit Wasserstoff an der Kathode bei einer angelegten Zellspannung von 0,114 V (Call & Logan, 2008). In der Praxis muss jedoch aufgrund von Überspannungen eine Zellspannung von mehr als 0,2 V für die kathodische Wasserstoffproduktion angelegt werden (Cheng & Logan, 2007). Zum Vergleich: Bei der konventionellen Wasserelektrolyse wird eine Zellspannung von über 1,8 V benötigt (Zhang &

Angelidaki, 2014) Neben der Speicherung von Wasserstoff als Energiequelle ist auch eine direkte Nutzung dieses Wasserstoffes als Elektronendonator von kathodisch wachsenden Mikroorganismen möglich. In der Literatur werden z. B. *Rhodobacter sphaeroides* (Schmid *et al.*, 2021), *Rhodopseudomonas palustris* (Brown, *et al.*, 2022) sowie *Sporomusa sphaeroides* und weitere Bakterien der *Clostridium*-Gattung (Aryal *et al.*, 2017) als produktive, kathodisch wachsende Mikroorganismen beschrieben. Hierbei ergibt sich ein breites Produktspektrum, von kurzkettigen flüchtigen Fettsäuren (engl. volatile fatty acid, VFA), wie Acetat, Propionat, Butyrat, über Alkohole (Ethanol, Butanol, Hexanol) bis zu komplexeren organischen Verbindungen, wie dem Bioplastik Polyhydroxybutyrat (Schmid *et al.*, 2021; Vassilev *et al.*, 2022).

Durch den Einsatz eines sehr breiten Substratspektrums ermöglicht die MEC-Anwendung eine sehr hohe Wasserstoffsäureausbeute (Badwal *et al.*, 2014). So konnte 2013 von Wang und Ren in MECs durch den Einsatz von Abfall als Substratgrundlage bis zu 3-fach höhere Wasserstoffproduktionsraten erreicht werden als in der herkömmlichen fermentativen Wasserstofferzeugung (Wang & Ren, 2013). 2007 zeigten Cheng und Kollegen, dass unter mischkultureller Verwertung des Substrates Cellulose eine Wasserstoffsäureausbeute von 63 % und für Glukose 64 % des theoretischen Maximums erreicht werden konnten (Cheng & Logan, 2007). Auch diese Ausbeute liegt vier- bis fünfmal höher als bei Glukose- oder Zellulosevergärungen (Ren *et al.*, 2021).

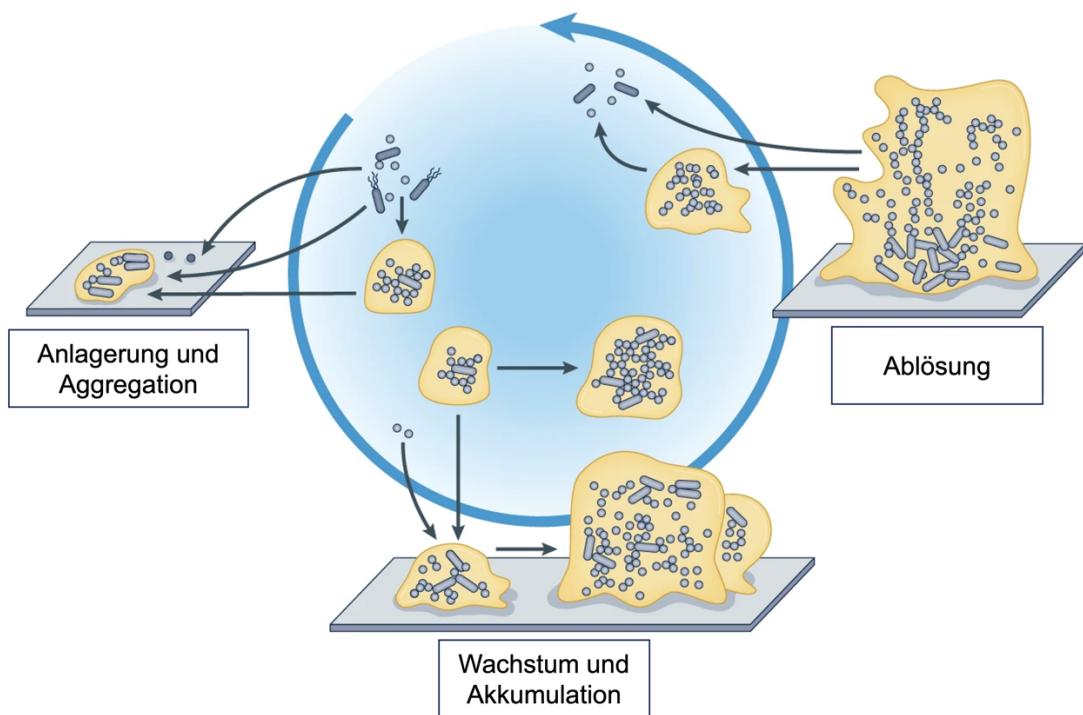
Die größte Herausforderung für die Kommerzialisierung der MEC sind die Kosten der Katalysatorelektroden aus Edelmetall und anderer zugehöriger Materialien (Logan & Rabaey, 2012) sowie die langsame Reaktionsgeschwindigkeiten, um praktisch relevante Wasserstoffproduktionsraten zu erreichen (Badwal *et al.*, 2014). Um die Reaktionsgeschwindigkeit und die Wasserstoffproduktion zu maximieren, stehen in der Elektromikrobiologie exoelektrogene Modellorganismen wie *Geobacter sulfurreducens* oder *Shewanella oneidensis* im Zentrum vieler Studien. Hierbei geht die Forschung sowohl auf den Elektronentransportmechanismus als auch auf die Fähigkeit der effektiven Biofilmbildung ein. Ein Biofilm, welcher sich auf einem leitfähigen Material bildet, und dessen Organismen diesen als Elektronenakzeptor oder Elektronendonator nutzen können, wird als elektroaktiver Biofilm (EAB) bezeichnet (Edel *et al.*, 2022). Bei EAB ermöglicht der extrazelluläre Elektronentransfer (EET) den Austausch von Elektronen zwischen Zellen und Oberflächen, womit Redoxreaktionen angetrieben werden, die für die Umwandlung von Substraten in Produkte erforderlich sind (Connors *et al.*, 2022).

## 2.2 Biofilme

Biofilme sind Akkumulationen von Mikroorganismen, die sich an Phasengrenzflächen (Gas-, Flüssigphasen; Flüssig-/ Festphasen oder Flüssig-/Flüssigphasen) ansiedeln (Slonczewski & Foster, 2012; Madigan *et al.*, 2020; Joshi *et al.*, 2021; Spormann, 2023). Es ist die natürliche Wachstumsform von bis zu 80 % der auf unserem Planeten lebenden Mikroorganismen (Römling, 2023).

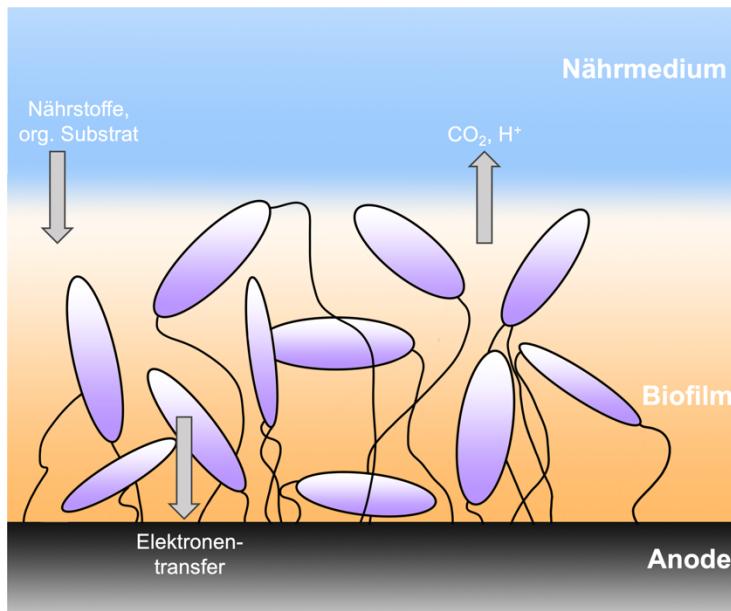
Die Bildung von Biofilmen wird durch die Anheftung einer einzelnen mikrobiellen Zelle oder eines Zellhaufens an eine organische oder anorganische Oberfläche eingeleitet (vgl. Abb. 2). Die angehefteten Zellen teilen sich, angetrieben durch die Nährstoffzufuhr über die Oberfläche. Nach Bildung von oberflächengebundenen Zellaggregaten folgt die vermehrte Synthese einer stark hydratisierenden extrazellulären Matrix, die aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) mit einem hohen Wasseranteil (>98 %) aufgebaut ist (Flemming *et al.*, 2007; Quan *et al.*, 2022). Durch diese gelartige EPS-Matrix, welche aus Polysacchariden, Proteinen, Nukleinsäuren und Zellstrukturen wie Pili besteht, können Mikroben eines Biofilms räumlich relativ zu einer Oberfläche und zueinander immobilisiert werden (Flemming *et al.*, 2007; Spormann, 2023). Eine EPS-Matrix kann außerdem die Toleranz vor antibiotischen Wirkstoffen, Prädatoren und Phagen erhöhen und die im Biofilm eingebetteten Organismen von weiterem Umweltstress abschirmen. Die exakte Zusammensetzung der EPS variiert extrem, je nach mikrobieller Population oder Umweltbedingung, welche auf einen Biofilm wirkt. Die Dicke eines reifen Biofilms kann von einer einzelnen Zellschicht bis Millimeterdicke reichen (Murga *et al.*, 1995). Sobald die internen Kohäsionskräfte, die einen Biofilm zusammen halten, oder die Adhäsionskräfte, die den Biofilm an einer Oberfläche verankern, geringer sind als externe physikalische Kräfte, verliert der Biofilm an Biomasse (Kanematsu & Barry, 2020). Der Abtrag von einzelnen Zellen kann durch physikalischen Scherstress (Erosion) oder durch Kollision mit Partikeln (Abrasion) ausgelöst werden. Der abrupte Verlust größerer Teile eines Biofilmes erfolgt meist erst in der späteren Phase der Biofilmbildung und wird in der Literatur als *sloughing* bezeichnet (Kaplan, 2010). Unabhängig vom Ablösungsprozess neigt der Basisbiofilm jedoch dazu, am Substratum haftenzubleiben und die äußere Schicht mit von den Mikroorganismen produzierten saccharolytischen Enzymen abzuschneiden (Joshi *et al.*, 2021).

Entgegen der oben beschriebenen „eher restriktiven“ (Sauer *et al.*, 2022) Sicht auf die Biofilmbildung, wird in aktuellen Publikationen davon ausgegangen, dass ein die Biofilmbildung treffenderes Modell auch **nicht** oberflächengebundene Zellaggregate mit einbeziehen sollte (Flemming *et al.*, 2021; Sauer *et al.*, 2022). Ein dynamischer Austausch zwischen einzelnen Zellen, oberflächengebundenen und nicht oberflächengebundenen Zellaggregaten, ist jederzeit möglich. Eine schematische Darstellung dieser „dynamischen Biofilmbildung“, mit oberflächengebundenen Biofilmen (äußerer Kreis) und nicht oberflächengebundenen Zellaggregaten (innerer Kreis), sowie dem Austausch beider, ist in Abbildung 2 dargestellt (Sauer *et al.*, 2022).



**Abb. 2: Aktuelles Modell der Biofilmbildung (abgewandelt nach Sauer *et al.*, 2022).** Das Schema zeigt die drei Hauptereignisse der Biofilmbildung, unabhängig von Oberflächenbindung eines Biofilms. Der äußere Ring der schematischen Darstellung beschreibt die Bildung und Entwicklung von oberflächengebundenen Biofilmen; der innere Ring zeigt nicht oberflächengebundene Biofilme sowie den Austausch zwischen beiden. **Anlagerung und Aggregation:** Während dieses Vorgangs aggregieren Bakterien untereinander oder heften sich an biotische oder abiotische Oberflächen. **Wachstum und Akkumulation:** Während dieses Vorgangs expandieren die aggregierten und angehefteten Bakterienkolonien durch Wachstum und Rekrutierung von Zellen aus der Umgebung. **Ablösung:** Verlust einzelner Bakterien oder Zellaggregate eines Biofilms.

Metabolisch benötigte Substrate werden häufig aus löslichen Verbindungen in der wässrigen Phase, mit der der Biofilm in Kontakt ist, gewonnen. Zwar kann bei limitierten Substratbedingungen auch die EPS-Matrix als Substratquelle genutzt werden; zum Aufbau dieser sind trotzdem externe Kohlenstoff- und Elektronenquellen nötig. In Biofilmen unterscheidet sich der Stofftransport stark von dem in einem planktonischen System, da der rein diffusive Stofftransport (ausgehend von der Gel-Artigen EPS-Matrix) zu einer Ausbildung von Gradienten und Heterogenität des Biofilmes führt. Solche Gradienten beinhalten sowohl die lokale Substratkonzentration als auch die vom Biofilm gebildeten Produkte. Handelt es sich bei dem Substrat beispielsweise um eine lösliche Verbindung in der wässrigen Phase, sind die Biofilmzellen in der Nähe der Aufwuchsfläche stärker substratlimitiert als die Zellen an der unmittelbaren Schnittstelle zur wässrigen Phase (Bulkphase) (Joshi *et al.*, 2021; Madigan *et al.*, 2020; Spormann, 2023). Bezieht man diese Substratlimitierung auf einen elektroaktiven Biofilm, muss beachtet werden, dass die Elektrode (Anode) ein weiteres Substrat (Elektronenakzeptor) für EAB darstellt. Eine schematische Darstellung von Stoffaustausch und Elektronentransport eines elektrochemisch aktiven heterotrophen Biofilms sowie der Austausch von Substanzen mit der Bulkphase, ist in Abbildung 2 gezeigt.



**Abb. 3: Schematische Darstellung von Stoffaustausch und Elektronentransport eines heterotrophen, elektrochemisch aktiven Biofilms.**

Zellen in den oberen Schichten des Anoden-respirierenden Biofilms haben, durch ihre räumliche Nähe zur Bulkphase, einen optimalen Zugang zu löslichen Elektronendonatoren, Nährstoffen und Puffersubstanzen, während die Zellschichten in der Nähe der Elektroden optimalen Zugang zu Elektronenakzeptoren haben (vgl. Abb. 2) (Bond *et al.*, 2002). Da somit beidseitige Limitierungen auf einen elektroaktiven Biofilm wirken können, haben unterschiedliche, in die EPS eingelagerte Substanzen, welche die Elektronen transferieren können, einen starken Einfluss auf die Leitfähigkeit und somit auf die respiratorische Produktivität von elektroaktiven Biofilmen (Engel *et al.*, 2019; Hu *et al.*, 2021; Knoll *et al.*, 2023).

Durch redox-aktive Proteine, wie Cytochrom *c*, können Elektronen über einen direkten Kontakt mit einer Elektrode ausgetauscht werden. In dieser erweiterten Elektronentransportkette werden primär Elektronen von einer Oxidoreduktase in den Menachinon-Pool der Cytoplasmamembran übertragen. Unterschiedliche cytoplasmatische Membranproteine können nun Chinole oxidieren und dabei die Elektronen weiter auf im Periplasma befindliche *c*-Typ Cytochrome übertragen (Marritt *et al.*, 2012). Die Elektronen werden von diesen *c*-Typ Cytochromen aus von auf einen Proteinkomplex übertragen, welcher die Elektronen an die Zelloberfläche transportiert, die dort von terminalen Reduktasen bei der Reduktion von Metallen oder Elektroden genutzt werden (Engel *et al.*, 2019; Sturm *et al.*, 2015).

Eine weitere in der Literatur stark erforschte Möglichkeit des direkten Elektronentransfers stellen leitfähige, Pili-artige Proteinkomplexe der äußeren cytoplasmatischen Membran dar. In *G. sulfurreducens* konnten Typ IV-Pili mit unterschiedlichen eingelagerten *c*-Typ Cytochromen nachgewiesen werden, welche auch Nanowires oder e-Pili genannt werden. Solche e-Pili können nicht nur zwischen Zelle und einer Elektrode ausgebildet werden, sondern auch in die EPS-Matrix ragen und somit Zell-Zell Kontakte ermöglichen. Somit können e-Pili-Netzwerke entstehen, welche die

Leitfähigkeit der EPS-Matrix erhöhen. So können sogar respiratorisch inaktive Zellen mit leitender Oberfläche oder leitenden Strukturen für die Elektronenübertragung genutzt werden. (Edel *et al.*, 2022; Engel *et al.*, 2019)

2010 wurde von Martins *et al.* berichtet, dass auch extrazelluläre DNA die Leitfähigkeit von Biofilmen erhöhen kann. Da extrazelluläre DNA aktiv zum horizontalen Gentransfer sezerniert als auch durch lysierte Zellen freigesetzt wird, kann von einer hohen Abundanz der extrazellulären DNA in einem Biofilm ausgegangen werden, welche in elektroaktiven Biofilmen als Nanofilament für den Elektronentransfer genutzt werden können (Edel *et al.*, 2022; Martins *et al.*, 2010). Da solche eDNA eine Länge von 1 kb – 10 kb aufweisen kann, kann durch eDNA-Nanofilament-Netzwerke die Effizienz der Elektronenübertragung zwischen EABs und Anode in einem bioelektrochemischen Systemen stark erhöht werden (Romero *et al.*, 2018; Engel *et al.*, 2019; Joshi *et al.*, 2021).

## 2.3 *Geobacter sulfurreducens*

Für die Effizienz der Elektronenübertragung zwischen Bakterien und Anodenoberflächen ist die Bildung eines elektroaktiven Biofilms auf der Anodenoberfläche in einem BES entscheidend (Baranitharan *et al.*, 2015). Ein exoelektogener, biofilmbildender Modellorganismus, bei dem die Ausbildung von Typ IV-Pili (Reguera *et al.*, 2006) und eine hohe Anzahl an *c*-Typ Cytochromen beschrieben wurde (Methé *et al.*, 2003), ist *Geobacter sulfurreducens*, der in einer Reinkultur anodische Biofilme mit einer Biofilmdicke von über 160 µm ausbilden kann. (Leang *et al.*, 2013).

*G. sulfurreducens* ist ein gramnegatives, strikt anaerobes chemolithoheterotrophes Bakterium, welches zur  $\delta$ -Unterkasse der Proteobakterien gehört (Methé *et al.*, 2003). Das 2-3 µm lange stäbchenförmige Bakterium weist einen Durchmesser von 0,5 µm auf und ist unbeweglich. Die optimale Wachstumstemperatur liegt zwischen 30 °C und 35 °C. Es besitzt ein zirkuläres Chromosom mit ca. 3814 kb und 3466 proteincodierenden Sequenzen. Als bevorzugter Elektronendonator dient Acetat, wobei die gewonnenen Elektronen zur Fe(III)-Reduktion genutzt werden. Prinzipiell ist ein Wachstum mit den Elektronendonatoren: Acetat, Wasserstoff, Laktat, Formiat und Kohlenmonoxid möglich, wobei typische Elektronenakzeptoren wie Fe(III)-Citrat, Fe(III)-Phosphat, Co(III), U(VI), S<sup>0</sup>, Fumarat und Malat reduziert werden können (Lovley *et al.*, 2011; Speers & Reguera, 2012; Geelhoed *et al.*, 2016; Lovley & Walker, 2019). *G. sulfurreducens* wird zwar den strikt anaeroben Bakterien zugeordnet, Lin *et al.* und Engel *et al.*, konnten jedoch ein mikroaerobes Wachstum von *G. sulfurreducens* beschreiben (Lin *et al.*, 2004; Engel *et al.*, 2019). Eine Diffusion von O<sub>2</sub> in die Anodenkammer einer mit *G. sulfurreducens* Reinkultur betriebenen MFC führt allerdings zu einer Reduktion der Stromproduktion (Nevin *et al.*, 2008). Nach Nevin *et. al.*, war die *G. sulfurreducens* Reinkultur unter anoxischen Bedingungen mit einer 18 % höheren Leistungsdichte (1,9 W m<sup>-2</sup>) einer aus Klärschlamm isolierten

Mischkultur ( $1,6 \text{ W m}^{-2}$ ) jedoch überlegen. Darüber hinaus hat sich gezeigt, dass niedrige Acetatkonzentrationen einen selektiven Druck zur Anreicherung von *Geobacter sp.* in Mischkulturen ausüben (Hari *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2020). Die Fähigkeit des effizienten extrazellulären Elektronentransfers bieten einen Selektionsvorteil für das Wachstum von *G. sulfurreducens* auf der Anode, gegenüber flexibleren und metabolisch vielseitigeren EAMs wie *Shewanella oneidensis* und verschaffen ihnen auch einen Wettbewerbsvorteil gegenüber Nicht-EAMs, wie acetoklastischen Methanogenen (Sapireddy *et al.*, 2021).

## 2.4. *Desulfuromonas acetexigens*

*Desulfuromonas acetexigens* ist wie *G. sulfurreducens* ein gramnegatives, strikt anaerobes chemolithoheterotrophes Bakterium, welches zur  $\delta$ -Unterklasse der Proteobakterien gehört und 1994 von Finster *et al.* aus Faulschlamm isoliert wurde (Finster *et al.*, 1994; Sapireddy *et al.*, 2021). Es ist bekannt dafür, dissimilatorisch Schwefel ( $S^0$ ) zu reduzieren (Finster *et al.*, 1994). Die ovoid geformten, ca.  $1 \mu\text{m}$  breiten und  $1,3 - 3,5 \mu\text{m}$  langen, nicht sporenbildenden Bakterien besitzen eine unipolar monotrich orientierte Geißel und sind motil (Finster *et al.*, 1997; Guo *et al.*, 2021). *D. acetexigens* gilt als mesophiles Bakterium, wobei seine optimale Wachstumstemperatur bei  $30^\circ\text{C}$  liegt. In planktonischer Kultur zeigt es eine pH-Toleranz zwischen  $6,4 - 8,5$ , der optimale pH-Wert liegt bei pH-Wert  $7,6 - 7,8$ . Unterhalb eines pH-Wertes von  $7,3$  wird eine Zellaggregation oder Klümpchenbildung beschrieben. (Finster *et al.* 1994).

2017 wurde das Genom von *D. acetexigens* von Katuri *et al.* sequenziert (Katuri, *et al.*, 2017). Das Genom weist eine Größe von  $3683 \text{ kb}$  auf, mit 3388 proteincodierenden Sequenzen (Katuri *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2021). In planktonischer Kultur gilt Acetat als einziger oxidierbarer Elektronendonator, bei gleichzeitiger Nutzung von elementarem Schwefel als Elektronenakzeptor und Reduktion zu Schwefelwasserstoff. Obwohl *D. acetexigens* als Desulfurikant beschrieben wurde, ist ihm die Nutzung der Elektronenakzeptoren Sulfat, Sulfid, Thiosulfat, Cystein, Nitrat oder Sauerstoff nicht möglich (Finster *et al.*, 1994). Alternative Elektronenakzeptoren können Fumarat in planktonischer Kultur oder Anoden in bioelektrochemischen Systemen darstellen. Insgesamt verfügt *D. acetexigens* über 56 c-Typ Cytochrome, welche einen externen Elektronentransport ermöglichen. Somit ist *D. acetexigens* in der Lage, Elektronen durch die innere Membran, das Periplasma und die äußere Membran aus dem Chinon/Chinol-Pool direkt auf eine Anode zu übertragen. Eine Fe(III)-Reduktion konnte bis heute noch nicht nachgewiesen werden. (Finster *et al.*, 1994; Katuri *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2021)

## 2.4.1 Aktuelle Anwendungsbereiche von *Desulfuromonas acetexigens*

Mehrere Studien berichten, dass *D. acetexigens* zusammen mit *G. sulfurreducens* in unterschiedlichen anodischen Biofilmen detektiert wurde, welche aus mischkulturellen Inokula, wie anaerobem Schlamm (Sapireddy *et al.*, 2021), häuslichem Abwasser (Ketep *et al.*, 2013a), Rohabfällen aus Papierfabriken (Ketep *et al.*, 2013b) und Lagunensediment (Ishii *et al.*, 2014) angereichert wurden. 2020 wurde gezeigt, dass eine Reinkultur des *D. acetexigens*-Stamms in der Lage ist, an der Anode einer MFC, welche mit 10 mM Acetat versorgt wurde, hohe Spitzenstromdichten von  $\sim 10 \text{ A m}^{-2}$  zu erzeugen (Katuri *et al.*, 2017; Katuri *et al.*, 2020). Es wird darauf eingegangen, dass auch Formiat bei anodischem Wachstum von *D. acetexigens* als Elektronendonator genutzt werden kann. Die maximal erreichte Stromdichte lag allerdings nur bei  $4,4 \pm 0,3 \text{ A m}^{-2}$  vs.  $10,6 \text{ A m}^{-2}$  mit Acetat als Substrat.

Der stromerzeugende Mischkulturbiofilm in einer MFC, kann trotz zeitlicher Schwankungen der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft über ein Jahr lang funktionell stabil bleiben (Ishii *et al.*, 2012). Die frühen Stadien wurden von *Geobacter sp.* dominiert, während in den späteren Stadien (reifer Biofilm) Bakterien, die eng mit *Desulfuromonas acetexigens* verwandt sind, vorherrschend waren (Ishii *et al.*, 2012). Im Vergleich der bioelektrischen Effizienz erreicht *Geobacter sulfurreducens* eine maximale Stromdichte von ca.  $8 \pm 0,5 \text{ A m}^{-2}$ , während *D. acetexigens* unter identischen Kultivierungsbedingungen  $11 \pm 0,1 \text{ A m}^{-2}$  produziert (Sapireddy *et al.*, 2021).

Ein weiterer Nachteil des Einsatzes von *G. sulfurreducens* in MECs ist die Verwertung von H<sub>2</sub> als Elektronendonator (Speers & Reguera, 2012; Engel *et al.*, 2019; Knoll *et al.*, 2023). Dies ist an der Coulomb'schen Effizienz (CE) (Kap. 3.5.1) von *G. sulfurreducens* Biofilmen in MECs zu erkennen. So lag im direkten Vergleich die CE von *G. sulfurreducens* bei  $110 \pm 10\%$ , während bei *D. acetexigens* CE von  $98 \pm 2\%$  detektiert wurden (Sapireddy *et al.*, 2021). Die ausbleibende Nutzung von H<sub>2</sub> als Elektronendonator von *D. acetexigens* führt somit zu einer höheren Wasserstoffausbeute (Finster, *et al.*, 1994; Katuri *et al.*, 2020; Sapireddy *et al.*, 2021), während die Nutzung von *Geobacter* Biofilmen in MEC in mehreren Studien zwar eine hohe Stromdichte, jedoch eine vergleichsweise ineffiziente Wasserstoffausbeute erzielte (Engel *et al.*, 2019; Kadier *et al.*, 2017; Sapireddy *et al.*, 2021).

Vor dem Hintergrund einer möglichst hohen Wasserstoffausbeute, wird in dieser Arbeit auf die bioelektrochemische Effizienz und die Biofilmmorphologie von *D. acetexigens* im Vergleich zu *G. sulfurreducens* in mikrobiellen Elektrolysezellen eingegangen.

# 3 Material und Methoden

## 3.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tab. 1 aufgeführt.

**Tab. 1:** Verwendete Bakterienstämme. Die jeweilige DSM-Nummer der Bakterienstämme verweist auf die Katalognummer des Leibnitz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen.

DSM-Nummer	Stamm	Relevanter Genotyp	Referenz
DSM 1397	<i>Desulfuromonas acetexigens</i> 2873	Wildtyp	Finster <i>et al.</i> (1994)
DSM 12127	<i>Geobacter sulfurreducens</i> PCA	Wildtyp	Caccavo <i>et al.</i> (1994)

## 3.2 Medien

In dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Biochemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (München, DE), Roth (Karlsruhe, DE), oder Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe, DE) bezogen.

Alle Medien zur bakteriellen Anzucht und der bioelektrochemischen Kultivierung (Tab. 2 – Tab. 8) wurden mit deionisiertem Wasser hergestellt und nach Einstellen des pH-Werts auf 7,4 für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert (VE-95 Autoklav, Systec GmbH & Co. KG, Linden, DE). Hitze- oder lichtempfindliche Medienbestandteile wurden mittels Sterilfiltration mit einer 0,22 µm Polyethersulfon-Membran (LLG, Meckenheim, DE) sterilisiert. Der pH-Wert wurde mit der pH-Elektrode CPS11D (Endress-Hauser, Weil am Rhein, DE) gemessen und über den Messumformer Liquiline CM442 - AAM bestimmt.

Als Anzuchtmittel für *D. acetexigens* und *G. sulfurreducens* wurde das BES-Anzuchtmittel (**bioelektrochemische Systeme, BES**; Kap. 2.1), nach Knoll und Kollegen verwendet (Tab. 2 – Tab. 5) (Knoll *et al.*, 2022).

**Tab. 2:** Zusammensetzung des BES-Anzuchtmediums für *Geobacter sulfurreducens* und *Desulfuromonas acetexigens* nach Knoll *et al.*, 2022.

Substanz	Konzentration
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,44 g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,22 g/L
NH <sub>4</sub> Cl	0,2 g/L
KCl	0,38 g/L
NaCl	0,36 g/L
Geobacter NB-Spurenelemente (100x)	10 mL/L
HEPES	11,192 g/L
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	0,21 g/L
Acetat	1,21 g/L
Fumarsäure	4,64 g/L
MM385 Selenit-Wolframatlösung (1000x)	1 mL/L
<i>ad</i> 978 mL ddH <sub>2</sub> O, pH auf 7,4 einstellen, anaerobisieren, autoklavieren. Zugabe von:	
Wolins Vitaminlösung (100x)	10 mL/L
10 % Hefeextrakt	10 mL/L
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O (0,4 M)	1 mL/L
10 % Casein-Hydrolysat	1 mL/L

**Tab. 3:** Zusammensetzung der Wolins Vitaminlösung (100x) des Minimalmediums MM141 der DSMZ.

Substanz	Konzentration
Biotin	2 mg/L
Pyridoxin-HCl	10 mg/L
Thiamin-HCl	5 mg/L
Riboflavin	5 mg/L
Nicotinsäure	5 mg/L
DL-Ca-Pantothenat	5 mg/L

Vitamin B <sub>12</sub>	0,1 mg/L
P-Aminobenzoësäure	5 mg/L
Liponsäure	5 mg/L
Biotin	2 mg/L
Folsäure	2 mg/L

**Tab. 4:** Zusammensetzung der Geobacter-NB-Spurenelementlösung (100x) (Hackbarth *et al.*, 2023).

Substanz	Konzentration
Nitrilotriessigsäure	2,14 g/L
<i>Ad</i> 500mL mit $\text{ddH}_2\text{O}$ , pH-Wert auf 6,5 mit KOH einstellen. Zugabe von:	
MnCl <sub>2</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	0,1 g/L
FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,3 g/L
CoCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	0,17 g/L
ZnSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,2 g/L
CuCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	0,3 g/L
AlK(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> *12 H <sub>2</sub> O	0,005 g/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,005 g/L
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	0,11 g/L
NiSO <sub>4</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	0,11 g/L
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	0,2 g/L
pH auf 7, autoklavieren, Lagerung im Dunkeln bei 4°C.	

**Tab. 5:** Zusammensetzung der Selenit-Wolframatlösung nach dem Minimalmedium MM385 der DSMZ.

Substanz	Konzentration
NaOH	0,5 g/L
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	3 mg/L
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	4 mg/L

In den bioelektrochemischen Experimenten (Kap. 4.2 – Kap. 4.4) wurden alle Bakterien in einem abgewandelten MEC-Reaktormedium (**microbial electrolysis cell**; Kap. 2.1) nach Sapireddy *et al.*, 2021 (Tab. 7 bis Tab. 10) kultiviert. Dieses Medium wurde im Laufe der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente verändert und optimiert. Zugegebene pH-Pufferlösungen sind in Tabelle 8 dargestellt.

**Tab. 6:** Zusammensetzung des veränderten MEC-Mediums nach Sapireddy *et al.*, 2021.

Substanz	Konzentration
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	0,6 g/L
NH <sub>4</sub> Cl	0,2 g/L
KCl	0,1 g/L
pH-Puffer	Nach Bedarf (Tab. 8)
Geobacter NB-Spurenelemente (100x)	10 mL/L
Acetat	0,605 g/L
Selenit-Wolframat	1 mL/L
<i>ad</i> 978 mL ddH <sub>2</sub> O, pH auf 7,4 einstellen, mit N <sub>2</sub> anaerobisieren, autoklavieren. Zugabe von:	
DSMZ 141 Vitaminlösung (100x)	10 mL/L
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O (0,4 M)	1 mL/L
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,4 g/L
10 % Casein-Hydrolysat	1 mL/L

### 3.3 Kultivierung von Bakterienstämmen

*D. acetexigens* (DSM 1397) wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Deutschland) als gefriergetrocknete Kultur bezogen und in einem Nährmedium gemäß den Empfehlungen der DSMZ (MM148, Anhang Tab. S1-S4) aktiviert und wie in Kap. 3.3.1 beschrieben konserviert.

Die Anzucht von Starterkulturen von *D. acetexigens* und *G. sulfurreducens* erfolgte im Tab. 2-5 aufgeführten Medium bei 30 °C im Brutschrank unter anoxischen Bedingungen (4-6 Tage; OD<sub>600</sub> von ca. 0.4).

Nach Anzucht wurden die Kulturen für 10 min mit der Standzentrifuge Rotana 460 R (Hettich, Tuttlingen, DE) bei 4600 g und 4 °C separat, in zuvor autoklavierten Zentrifugegefäß (BN:0512; Hettich, Tuttlingen, DE) zentrifugiert und in 20 mL einer sterilfiltrierten (vgl. Kap. 3.6.1) Salzlösung

resuspendiert (Tab. 7). Die Kultivierungen in bioelektrochemischen Systemen erfolgte mit dem in Tab. 6 aufgeführten MEC-Medium nach Sapireddy *et al.* bei 30 °C unter anoxischen Bedingungen (Sapireddy *et al.*, 2021). Die Prozessparameter und Einstellungen der bioelektrochemischen Kultivierung sind in Abschnitt 3.5 aufgeführt. Um eine Bereitstellung weiterer Kohlenstoffquellen, neben den in Tab. 6 dargestellten, auszuschließen, wurde in entsprechend beschriebenen Versuchen (vgl. Kap. 4.2, Kap. 4.4) der HEPES pH-Puffer durch einen Phosphat pH-Puffer ausgetauscht. (Tab. 8).

**Tab. 7:** Zusammensetzung der Salzlösung zur Resuspension von zuvor zentrifugierten Bakterien.

Substanz	Konzentration
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,44 g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,22 g/L
NH <sub>4</sub> Cl	0,2 g/L
KCl	0,38 g/L
NaCl	0,36 g/L

**Tab. 8:** Zusammensetzung unterschiedlicher pH-Puffer.

Pufferlösung	Substanz	Konzentration
HEPES-Puffer	HEPES	25 mM
Phosphat-Puffer	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,716 g/L
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,345 g/L

### 3.3.1 Konservierung von Bakterienstämmen

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme wurden als Gefrierkultur konserviert. Die entsprechende Kultur wurde in der Wachstumsphase geerntet in sterile CryoPure 1,8 mL-Gefäße (SARSTEDT AG & Co. KG; Nümbrecht, DE) überführt und anschließend mit zuvor autoklaviertem Glycerin (finale Glycerinkonzentration 35 %) versetzt. Durch die unmittelbare „Schockgefrierung“ in Flüssigstickstoff konnte eine stabile Lagerung der Gefrierkulturen bei - 80°C in einem Ultratiefkühlschrank (EWALD V86-120.1; EWALD Innovationstechnik AG, Rodenberg, DE) ermöglicht werden. Zur Rekultivierung wurden die Stämme unter sterilen Bedingungen in anaerobisiertes BES-Anzuchtmedium (Tab. 2 - 5) überführt.

### 3.4 Phylogenetische Charakterisierung

Für die phylogenetischen und physiologischen Charakterisierung der in Kapitel 4.4 beschriebenen Fragestellung wurde auf die Illumina-Sequenzierung zurückgegriffen. Das Probenmaterial (Tab. 9) wurde dem privaten Institut für molekulare Analytik Karlsruhe GmbH (IMA, Karlsruhe, DE) zur Analyse der mikrobiellen Diversität (16S-rDNA Amplikon-Sequenzierung) übergeben. Dies umfasste die DNA-Isolation, die 16S-rDNA-PCR auf die isolierte gDNA, die Indexierung und die Aufreinigung des PCR-Produktes inklusive der qualitativen Analyse. Nach Amplikon-Sequenzierung (2 x 250 bp, min 50.000 reads) erfolgte die bioinformatische Auswertung sowie die phylogenetische Einordnung mit Hilfe der SILVIA 16S Datenbank.

**Tab. 9:** Darstellung des Sequenzierten Probenmaterials.

Probenbeschreibung	Organismus	Experiment
Gefrierkultur		
anodischer Biofilm		
	<i>D. acetexigens</i>	Des3B
kathodischer Biofilm		
planktonische Zellkultur		
Gefrierkultur		
anodischer Biofilm		
	<i>G. sulfurreducens</i>	Geo1B
kathodischer Biofilm		
planktonische Zellkultur		

Zur Gewinnung der planktonischen Zellkulturen wurden nach Abschluss der Kultivierungen (Des3B und Geo1B) unter sterilen Bedingungen 45 mL des jeweiligen MEC-Mediums (Kap. 3.2) aus der Fließzellenperipherie (vgl. Kap. 3.5.2, Abb. 4) entnommen. Diese wurden in 50 mL Falcons für 10 min mit der Standzentrifuge (vgl. Kap. 3.3) bei 4600 g und 4 °C zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurden weitere 45 mL zugeführt, die nach erneutem Zentrifugieren und Dekantieren bei -80 °C gelagert wurden. Alle anodischen oder kathodischen Biofilme wurden nach Abbau der Fließzellen mit Hilfe steriler 1 mL-Pipettenspitzen abgetragen, in 2 mL Mikroreaktionsgefäß gegeben und bei -80 °C gelagert. Die zur Anzucht genutzten Gefrierkulturen (Kap. 3.3.1) wurden für 60 Sekunden bei 16000 g

mit der Tischzentrifuge (Biofuge pico, Kendro, Osterode, DE) pelletiert, der Überstand entnommen und das Pellet bei – 80 °C gelagert.

## 3.5 Elektrochemische Methoden

### 3.5.1 Chronoamperometrie

Die Chronoamperometrie ist eine elektrochemische Messmethode, bei welcher die bei konstantem Potential (gegen Referenzelektrode) an der Arbeitselektrode gemessenen Stromstärken über die Zeit aufgezeichnet werden. Dabei legt ein Potentiostat (vgl. Kap. 3.5.1) mithilfe eines variablen Potentials der Gegenelektrode ein definiertes, konstantes Potential an der Kathode an. Die dabei an Arbeitselektrode gemessene Stromstärke wurde in einminütigen Intervallen gemessen und von einem Computer aufgezeichnet. Das Arbeitselektrodenpotential wurde unter Verwendung einer in KCL gesättigten Ag/AgCl - Referenzelektrode auf -196 mV eingestellt. Zur Vereinheitlichung werden alle Potentiale in dieser Arbeit immer in Bezug auf eine Standard-Wasserstoff-Elektrode (engl. *standard hydrogen electrode*, SHE) angegeben (+196 mV vs. Ag/AgCl). Das Arbeitselektrodenpotential von – 196 mV vs. Ag/AgCl entspricht also einem Potential von 0 mV gegen SHE unter Standartbedingungen (pH 7; T = 25 °C) (Fuchs *et al.*, 2022). Eine Ausnahme stellt die chronoamperometrische Analyse Des1 dar, deren Durchführung Kapitel 4.2.1 entnommen werden kann. Als Negativkontrollen dienten das genutzte bioelektrochemische System in unbeimpftem Zustand. Vor Inokulation wurde das, der Fließzellenperipherie zugegebene MEC-Medium (Kap. 3.2, Tab. 6) durch einen Austausch der Gasphase im Medientank mit 100 % N<sub>2</sub> (Kap. 3.5.2; Abb. 5) für 24 h anaerobisiert, um noch enthaltenen Sauerstoff auszutreiben. Die Reaktoren wurden stets dreiprozentig (v/v) mit finalen Zellkonzentrationen zwischen 8 x 10<sup>7</sup> bis 3 x 10<sup>8</sup> lebendigen Zellen pro mL beimpft. Dies entspricht einer optischen Dichte von OD<sub>600</sub> = 0,1 – 0,35 (vgl. Kap. 4.1). Vor jeder chronoamperometrischen Messung wurde der interne Widerstand zwischen Arbeits- und Referenzelektrode (Ru-Wert; engl. **uncompensated resistance**) gemessen und die Kontaktierungen zwischen den Elektroden mit dem Potentiostat bei einem Überschreiten des Ru-Wertes von 8 Ohm überprüft. In dieser Arbeit wurde die Arbeitselektrode als Anode und die Gegenelektrode als Kathode verwendet.

Für die Auswertung und den Vergleich der in dieser Arbeit durchgeföhrten bioelektrochemischen Experimente (vgl. Tab. 11) erfolgte die Berechnung der mittleren Stromdichte über einen jeweils definierten Messzeitraum (1) und der Coulomb'schen Effizienz (3):

**Berechnung der mittleren Stromdichte:**

Hierfür wurde zunächst die Stromdichte  $J$  ( $\mu\text{A cm}^{-2}$ ) aus dem Bezug der gemessenen Stromstärke ( $I$ ) mit der Fläche der Arbeitselektrode  $A_{Anode}$  (Anode;  $20 \text{ cm}^2$ ) berechnet. Die Berechnung ist in Formel 1 zu sehen.

$$J = \frac{I}{A_{Anode}} \quad (1)$$

Die mittlere Stromdichte über die betrachtete Betriebszeit  $t$  des jeweiligen bioelektrochemischen Experiments wurde mit folgender Formel 2 errechnet:

$$\bar{J} = \frac{\int J(t) dt}{t} \quad (2)$$

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

Die Evaluierung der anodischen Oxidation erfolgte über die Berechnung der Coulomb'schen Effizienz (CE) nach Rabaey & Verstraete, 2005. Die CE gibt das Verhältnis zwischen gemessenem Strom ( $I$ ) und den im Stoffwechsel freigesetzten Elektronen an. Somit kann bestimmt werden, wie viele der theoretisch während der katalytischen Umsetzung eines Substrates freigesetzten Elektronen in die Stromproduktion fließen, was Hinweise auf die bioelektrochemische Effizienz des jeweiligen Prozesses gibt. Die Berechnung erfolgte nach Formel 3.

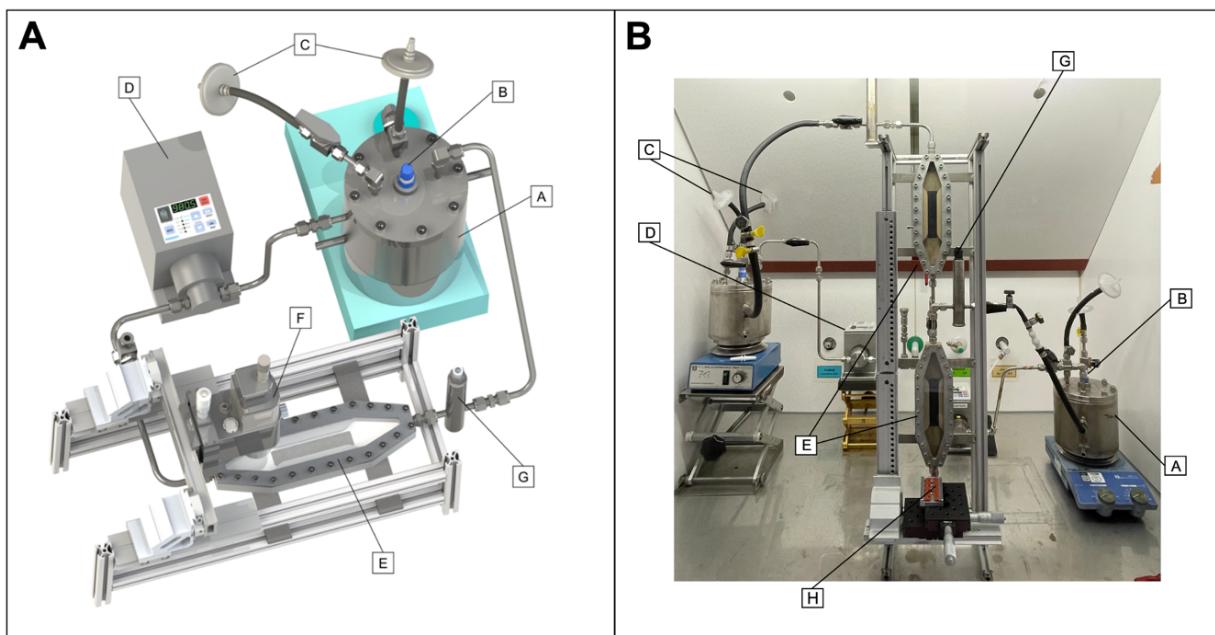
$$CE = \frac{\int_0^t I}{\Delta c * V_R * e^- * \varepsilon * N_A} \quad (3)$$

Um diesen Wert zu berechnen, wurde zunächst der während einer betrachteten Betriebszeit  $t$  produzierte Gesamtstrom durch entsprechende Integration der gemessenen Stromstärke ( $I$ ) bestimmt. Dieser Strom wurde durch die Gesamtmenge der metabolisch freigesetzten Elektronen geteilt. Letztere wurde durch die Menge des Acetatverbrauchs ( $\Delta c$ ), des Reaktorvolumens ( $V_R$ ), der Anzahl der Elektronen, die bei der Umwandlung von 1 mol Acetat in  $\text{CO}_2$  freigesetzt werden (vollständige Oxidation,  $e^- = 8$ ), der Elementarladung ( $\varepsilon = 1,602 * 10^{-19} \text{ C}$ ) und der Avogadro-Konstanten ( $N_A = 6,022 * 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ ) berechnet. Die Konzentration der organischen Säuren wurde wie in Kapitel 3.6.1 beschrieben mittels Ionenaustauschchromatographie bestimmt.

### 3.5.2 Aufbau der Fließzellenperipherie

Die in dieser Arbeit verwendete mikrobielle Fließzelle wurde von Max Hackbarth entwickelt, um konstante Kultivierungsbedingungen sowie optische Biofilmanalysen mittels OCT (Kap. 3.7) zu gewährleisten (Hackbarth *et al.*, 2020). Abb. 4A zeigt die Fließzellenperipherie nach Hackbarth *et al.*, 2020. Im Gegensatz zu vorherigen Arbeiten wurde die Fließzelle in dieser Arbeit vertikal positioniert,

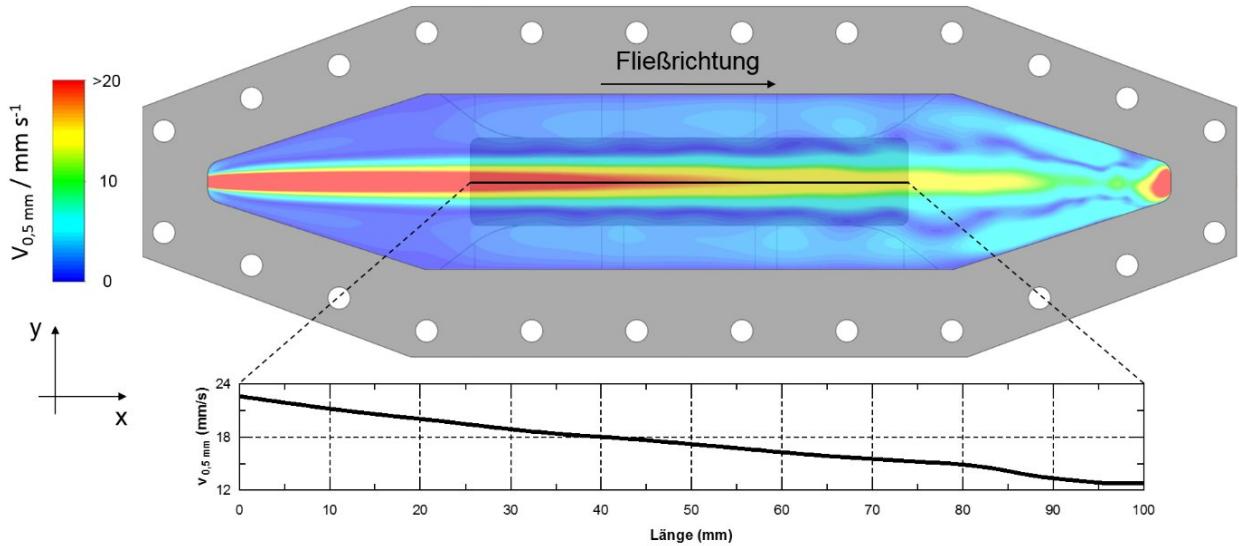
um eine passive Ablagerung von Zellen auf der Elektrodenoberfläche durch Sedimentation zu vermeiden. Damit werden nur solche Zellen dem Biofilm zugeordnet, welche aktiv an der Biofilmentwicklung beteiligt sind. Da in mikrobiellen Elektrolysezellen (Kap. 2.1) bei einem Elektronenfluss von der Anode zur Kathode H<sub>2</sub> an der Kathode entsteht, konnte durch vertikale Positionierung des Fließzellenkanals (E) eine längere Verweilzeit mit einer intensiven Blasenbildung des Wasserstoffes über der Arbeitselektrode umgangen werden. Hierbei wurde zum einen die laminaren Strömungsbedingungen (vgl. Abb. 5) nicht eingeschränkt und die Biofilmbildung nicht durch vermehrte Erosion und Abrasion (vgl. Kap. 2.2) beeinträchtigt. In Abb. 4B ist die Peripherie mit vertikalem Fließzellenkanal dargestellt.



**Abb. 4: Darstellung der verwendeten Fließzellenperipherie.** **A:** Zur Anschaulichkeit wurde nach Absprache diese Abbildung aus Hackbarth et. al., 2020 entnommen. A: Medientank; B: pH-Elektrode; C: an einen Kugelhahn angeschlossene Belüftungsfilter; D: Magnetzahnradpumpe; E: Fließzellenkanal mit Arbeits-, und Gegenelektrode; F: Ganymede OCT-Kopf mit einer LSM04-Linse. **B:** In dieser Arbeit wurden die Fließzellenkanäle E senkrecht positioniert mit aufwärts gerichtetem Medienfluss. Zu sehen sind zwei mikrobielle Fließzellensysteme die übereinander angebracht wurden. Vor dem Fließzellenkanal befindet sich die Halterung für den OCT-Kopf H, welche sich am links befindlichen Stativ auf genaue Positionen in vertikalen Abständen von 1 cm einstellen lässt. Somit konnte die komplette Länge der Arbeitselektrode visualisiert werden.

Der doppelwandige Medientank (A) ist aus rostfreiem Edelstahl (V316Ti) gefertigt. Die Temperatur des Mediums im Tank wurde über ein externes Umwälzthermostat (Dyneo, Julabo Seelbach, DE) reguliert. Der Temperaturverlauf und der pH-Wert wurden über die pH-Elektrode CPS11D (Endress-Hauser, Weil am Rhein, DE) erfasst und mit dem Messumformer Liquiline CM14 – AAM (Endress-Hauser, Weil am Rhein, DE) bestimmt. Mit einem Magnetrührer (CombimagReo, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, DE) wurde das im Tank befindliche Medium bei 300 rpm durchmischt. Durch die sich auf dem Deckel des Medientanks befindlichen 2-Wege Kugelhähne (Swagelok, Düsseldorf, DE) mit

angeschlossenem 0,2 µm Midisart® 2000 Belüftungsfilter (Sartorius, Göttingen, DE) (C) konnte dem System sowohl Medium zugeführt, als auch die Gasphase ausgetauscht werden, um das System konstant anaerob zu halten. Über die Magnetzahnradpumpe (ISMATEC Reglo-Z Digital, Cole Parmer Wertheim, DE) (D) wurde das Medium, wenn nicht anders beschrieben, mit einer volumetrischen Durchflussrate von 100 mL min<sup>-1</sup> rezirkuliert. Damit ergibt sich die in Abb. 2 dargestellte direkte Strömungsgeschwindigkeit von 22 cm s<sup>-1</sup> – 12 cm s<sup>-1</sup>, definiert für die Ebene 500 µm über der Arbeitselektrode (Hackbarth *et al.*, 2020).



**Abb. 5: Strömungsfeld im Inneren der Fließzelle mit einem Geschwindigkeitsgefälle von links nach rechts.** Der Anodenbereich wird durch den schattierten Bereich (100 mm Länge, 20 mm Breite) in der Mitte des Strömungskanals dargestellt [nach Absprache übernommen von Max Hackbarth, (Hackbarth *et al.*, 2020)]

Die Fließzelle (E) wurde aus Polyether-Ether-Keton gefertigt (detaillierte Abbildung ersichtlich im Anhang, Abb. S1). Darin wurde ein leitfähiges Substrat für das Wachstum von elektroaktiven Mikroorganismen eingelassen. Dies besteht aus einer 20 mm x 100 mm großen Graphit-Arbeitselektrode (MR40. Müller und Rössner, Troisdorf-Bergheim, DE) wobei 6 V4A-Edelstahl Gegenelektroden eine Gesamtoberfläche von ebenfalls 2000 mm<sup>2</sup> aufweisen. Diese Gegenelektroden befinden sich oberhalb der Arbeitselektroden an den Seiten des Fließkanals, wobei die Kontaktfläche der Arbeitselektrode zugewandt ist (vgl. Abb. S1). Alle Elektroden wurden von außen mittels Titanschrauben mit den Kabeln des Potentiostaten konnektiert. Die Fließzelle wird nach oben mit einer Polycarbonat-Scheibe verschlossen. Diese Scheibe ermöglicht als Sichtfenster eine nicht-invasive in-situ Visualisierung des Biofilms mittels OCT (Kap. 3.7). Durch Fixierung des OCT-Kopfes (F) an einer stabilen Halterung (H) konnten die Messpositionen reproduzierbar eingestellt werden. Vor dem Einlass der Fließzelle konnten über einen Dreiegehahn (Discofix®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE) Proben entnommen werden. Hinter dem Auslass der Fließzelle wurde eine Ag/AgCl Referenzelektrode (Gamry, Warminster, USA) eingesetzt. Arbeits-, Referenz- und Gegenelektroden waren mit dem Potentiostat (Interface 1010 B oder Interface 5000 P; Gamry, Warminster, USA) verbunden. Der Einlass des

Mediums befand sich am unteren Ende der vertikalen Anordnung und der Auslass am oberen Ende (vgl. Abb. S1). Alle bioelektrochemischen Experimente wurden unter Nutzung der Software Framework (Gamry, Warminster, USA) durchgeführt.

## 3.6 Analytische Methoden

### 3.6.1 Ionenaustauschchromatographie

Die Konzentrationen der flüchtigen Fettsäuren (Formiat, Acetat, Butyrat, Iso-Butyrat, Valeriansäure und Propionat) sowie Laktat wurden mittels der Ionenaustauschchromatographie (IC) (Metrohm 881 Compact Pro) bestimmt. Dafür wurde der Säulentyp Metrosep Organic Acids 250/7.8 genutzt. Um im Kalibrierbereich des Chromatographen (zwischen 0,5 – 100 mg/L) zu bleiben, wurden alle Proben steril filtriert (0,22 µm PES-Membran, LLG, Meckenheim, DE), wonach diese mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  1 zu 7,5-fach verdünnt wurden. Das jeweils dem Experiment entnommene Probenvolumen betrug zwischen 2,5 – 5 mL.

### 3.6.2 Gaschromatographie

Die Konzentration von Alkanolen (Methanol, Ethanol, 2-Propanol) wurde mittels der Gaschromatographie (Agilent 7890B-Gaschromatograph Agilent, Waldbronn, DE) ermittelt. Nach Erhitzen der sich in gesättigter  $\text{NaCl}_2$  Lösung befindlichen Proben auf 90 °C wurden die Retentionszeiten der Substanzen mittels eines Flammenionisationsdetektors bestimmt und durch Nutzung des Programms Agilent ChemStation (Agilent, Waldbronn, DE) quantifiziert. Da Flammenionisationsdetektoren bei Alkanolen einen Messfehler zwischen 3 % - 10 % aufweisen können, wurde jede Probe als Duplikat analysiert. Hierfür wurde ein Gesamtvolumen von 21 mL gewählt.

### 3.6.3 Zellquantifizierung

Die optische Zelldichte aller in dieser Arbeit beschriebenen bakteriellen Kultivierungen wurde mit den Photometern Spectronic 1201 (Milton Roy, Rodgau, DE) oder Lambda XLS+ (PerkinElmer, Rodgau, DE) nach Herstellerangaben bei 600 nm gemessen. Zuvor wurden die Proben auf eine optische Dichte ( $\text{OD}_{600}$ ) von maximal 0,5 verdünnt.

Die Bakterienzellzahl von planktonischen Zellkulturen wurde mittels des NovoCyte® Durchflusszytometers (Agilent, Waldbronn, DE) und der Software NovoExpress (Agilent, Waldbronn, DE) nach Herstellerangaben bestimmt. Um eine ausreichende Mischung und Inkubation der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR - green (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, DE), bei 37 °C zu gewährleisten, wurde der ThermoMixer® C (Eppendorf, Hamburg, DE) genutzt.

## 3.7 Charakterisierung des Biofilms

### 3.7.1 Optische Kohärenz-Tomographie (OCT)

Der elektroaktive Biofilm in den Fließzellen wurde mittels des GANYMEDE II spectral domain OCT System (Thorlabs GmbH, Dachau, DE) und der LSM04 Linse (Thorlabs GmbH, Dachau, DE) visualisiert. Bei allen Experimenten wurden OCT-Bilder der Arbeitselektrode vor Inokulation der Bakterien als Negativprobe aufgenommen. Wenn nicht anders beschrieben wurden nach Inokulation in regelmäßigen Abständen an drei definierten Positionen (A, B, C) entlang der Anode dreidimensionale OCT Aufnahmen (C-scans; Horn und Wagner, 2017) angefertigt, um das Verhalten der Biofilmbildung in Abhängigkeit der Strömungsgeschwindigkeit zu ermitteln. Die über dem Biofilm herrschenden Strömungsbedingungen haben sowohl Einfluss auf dessen Struktur sowie auf den Massentransfer von gelösten Substraten (Hackbarth *et al.*, 2020; Steward und Stewart, 2012). Diese Strömungsgeschwindigkeit weist über der untersuchten Anode mehrere Gradienten auf (vgl. Abb. 5, Kapitel 3.5.2). Position **A**: 1 cm über der unteren Strömungskante der Arbeitselektrode, Position **B**: 4 cm über Position A, (mittiger Zentralpunkt der Arbeitselektrode) und Position **C**: 1 cm unter der oberen Strömungskante der Arbeitselektrode gewählt (vgl. Abb. 21). Die genauen Messpositionen wurden aus Hackbarth *et al.*, 2020 übernommen.

Die OCT-Aufnahmen resultieren in einem dreidimensionalen Datensatz mit den Abmessungen 8 mm x 6 mm x 1,75 mm; (B x L x H), mit einer Pixelauflösung von  $2,06 \mu\text{m px}^{-1}$  (axial, z-Richtung) und  $8 \mu\text{m px}^{-1}$  (lateral, xy-Ebene). Dies führt zu einer visualisierten Fläche von  $48 \text{ mm}^2$ . Um die Biofilmmorphologie auch in den Randbereichen der Anode zu analysieren wurden breitere Bildabmessungen (15-16 mm x 6 mm x 1,5 mm; B x L x H) gewählt. Somit konnte das Biofilmwachstum auf bis zu 80 % der Anodenbreite visualisiert werden. Bei Aufnahmen der gesamten Arbeitselektrodenlänge wurden 11 Aufnahmen nach Hackbarth *et al.*, 2020, mit einer Bildbreite von 8 mm aufgenommen. Die anschließende Datenverarbeitung und Auswertung erfolgte mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ nach Hackbarth *et al.*, 2020; Bauer *et al.*, 2019; Hackbarth *et al.*, 2023 und Wagner & Horn, 2017, wobei die genutzten Makros zur Berechnung aller im folgenden beschriebenen Parameter im Anhang ersichtlich sind.

Bei der Bildauswertung mussten zunächst die durch den Biofilm verursachten Signale von Hintergrundsignalen getrennt werden. Um miteinander vergleichbare Daten zu generieren, wurden die Rohdaten immer mit der gleichen Vorgehensweise binärisiert (siehe Macros im Anhang; *OCT untilt*). Das Thresholding erfolgte mit der Funktion *AutoThreshold* nach der Methode „Otsu“ (Otsu, 1979). Zur weiteren Charakterisierung der Biofilmstruktur wurden insgesamt sechs Parameter berechnet.

Durch das Auszählen der Pixel in den oben beschriebenen Binärdateien und Multiplikation dieser Anzahl mit dem Volumen der entsprechenden Voxel konnte das Volumen des Biofilms  $V_{BF}$  an der jeweiligen Position bestimmt werden.

Das Biofilmvolumen  $BV$  ( $\mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$ ) (4) ist das Volumen des Biofilms  $V_{BF}$  bezogen auf die visualisierte Fläche  $A_S$ :

$$BV = \frac{V_{BF}}{A_S} \quad (4)$$

Das mittlere Biofilmvolumen  $\overline{BV}$  ist nach folgender Formel (5) definiert:

$$\overline{BV} = \frac{\sum BV_n}{N} \quad (5)$$

wobei  $n$  für den einzelnen Standort/Scan steht und  $N$  die Anzahl der aufgezeichneten Datensätze angibt ( $N = 3$  für die Positionen A, B, C;  $N = 11$  für die gesamte Anode).

Die Biofilm-Akkumulationsrate  $BV^*$  ( $\mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ) (6) ist die Änderung des Biovolumens über die Zeit:

$$BV^* = \frac{\partial BV}{\partial t} \quad (6)$$

Für jede Aufnahme wurde ebenfalls mit ImageJ die Biofilmdicke ( $L_{F,i}$ ) ermittelt, woraus neben dem Höhenprofil eine Höhenverteilung, die gemittelte Biofilmdicke  $\bar{L}_F$  ( $\mu\text{m}$ ) (7), der Rauheitskoeffizient ( $R_a^*$ ) (8) sowie der Bedeckungsgrad  $SC$  (engl. *substratum coverage*) (9) nach Wagner und Horn (2017) bestimmt werden konnte:

$$\bar{L}_F = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N L_{F,i} \quad (7)$$

Hierbei ist  $L_{F,i}$  ( $\mu\text{m}$ ) der senkrechte Abstand zwischen der Anodenoberfläche und der Grenzschicht zwischen Biofilm und Medium an der Stelle  $i$  (lokale Biofilmdicke) (Okkerse *et al.*, 2000).  $N$  ist die Anzahl der Messungen und entspricht für einen kompletten C-Scan der Anzahl aller A-Scans (Wagner und Horn, 2017).

Aus der Differenz der lokalen Biofilmdicke  $L_{F,i}$  zur gemittelten Biofilmdicke  $\bar{L}_F$  kann ein weiterer Parameter, der Rauheitskoeffizient  $R_a^*$  berechnet werden.

$$R_a^* = \frac{\sum |L_{F,i} - \bar{L}_F|}{\bar{L}_F} \quad (8)$$

Der Bedeckungsgrad  $SC$  [%] stellt das Verhältnis zwischen von Biofilm bedeckter Anodenoberfläche zur insgesamt gescannten Fläche dar:

$$SC = \frac{A_S - A_0}{A_S} \quad (9)$$

mit  $A_0$  als der zum Messzeitpunkt unbedeckten Anodenoberfläche, mit der Biofilmdicke  $\bar{L}_F = 0$ . Dabei wurden die untersten 2,06  $\mu\text{m}$  (Höhe eines Pixels) oberhalb der gemessenen Anodenoberfläche abgeschnitten, um eine Verfälschung des bestimmten Bedeckungsgrades durch eventuelle Unebenheiten der Anodenoberflächen zu verringern.

# 4 Ergebnisse und Diskussion

Zur Beurteilung der Eignung des elektroaktiven Bakteriums *Desulfuromonas acetexigens* (Kap. 2.4, Kap. 3.1) für die Nutzung in mikrobiellen Elektrolysezellen sollte in chronoamperometrischen Analysen (CA; Kap. 2.1; Kap. 3.5.1) die Biofilmbildung und die anodischen Stromdichten mit denen des Modellorganismus *Geobacter sulfurreducens* (Kap. 2.3, Kap 3.1) verglichen werden.

Im ersten Unterkapitel des Ergebnisteils (Kap. 4.1) werden das planktonische Wachstumsverhalten von *D. acetexigens*, sowie die Ergebnisse der Durchflusszytometrie (Kap. 3.6.3) im direkten Vergleich mit Befunden aus Publikationen zu *D. acetexigens* diskutiert. Dabei werden die Wachstumsraten von *D. acetexigens* untersucht, um eine optimale planktonische Kultivierungsroutine im Laboralltag zu entwickeln. Außerdem wird die Korrelation zwischen den in den Publikationen angegebenen Zellzahlen pro Volumen und der in dieser Arbeit ermittelten optischen Dichte OD<sub>600</sub> bestimmt, um eine Vergleichbarkeit mit Ergebnissen aus der Literatur zu schaffen. Im zweiten Unterkapitel (Kap. 4.2) werden die bioelektrochemischen Kultivierungen von *D. acetexigens* und *G. sulfurreducens* dargestellt. Dabei werden die Biofilmbildung, die Biofilmmorphologie und die spezifische Umsatzleistung beider Stämme miteinander verglichen. Im dritten Unterkapitel (Kap. 4.3) wird aufgezeigt, inwieweit die Reduktion der OCT-Aufnahmen des Biofilms auf drei Positionen entlang der Anode eine repräsentative Charakterisierung des kompletten Biofilmbewuchses zulässt. Im vierten Unterkapitel (Kap. 4.4) wird der Substratumsatz der bioelektrochemisch kultivierten Stämme diskutiert, insbesondere bezüglich der unerwarteten Nutzung weiterer Kohlenstoffquellen. Außerdem werden in diesem Abschnitt die Sequenzierungsdaten zu zwei Kultivierungen gezeigt und die darin nachgewiesene phylogenetische Diversität taxonomisch klassifiziert und diskutiert.

## 4.1 Wachstumsverhalten von *D. acetexigens*

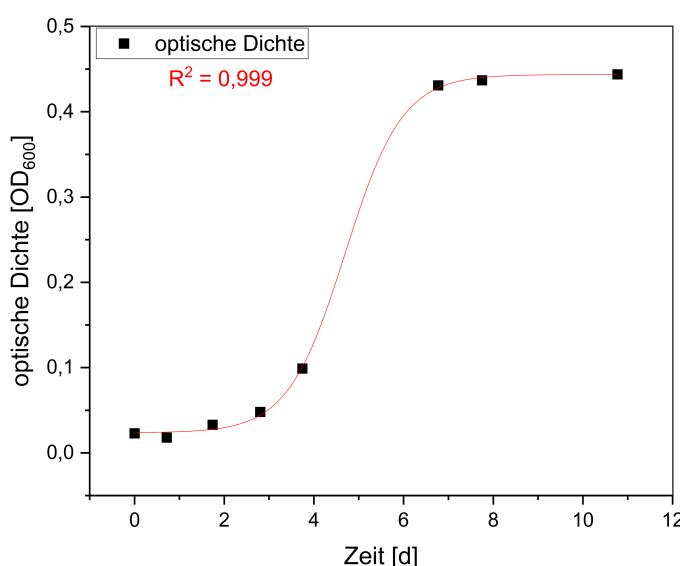
In der vorliegenden Arbeit sollte der Organismus *Desulfuromonas acetexigens* als *proof of concept* in mikrobiellen Fließzellen im Labormaßstab implementiert werden. Wie in Kapitel 2.4 erläutert, wird *D. acetexigens* in der Literatur als ein elektroaktiver, strikt anaerober Desulfurikant (S<sub>0</sub> reduzierend) beschrieben (Finster *et al.*, 1994; Katuri *et. al.*, 2017; Nguyen *et al.*, 2024; Kap. 2.4.1). Zunächst sollte durch anaerobe Flaschenkultivierung des Organismus eine Einschätzung des Wachstumsverhaltens erlangt werden. Außerdem stellte sich die Frage, ob eine generelle Kultivierung dieses Organismus ohne Anaerobenkammer überhaupt möglich ist.

Guo *et al.* zeigten 2021, dass *D. acetexigens* mehrere Gene besitzt, welche für Proteine codieren, die an der ROS- (Reaktive-Sauerstoffspezies, engl. *reactive oxygen species*) Detoxifizierung beteiligt sind. Diese Proteine umfassen: Rubrerytin (*rbr*), Rubredoxin (*rub*), Desulfoferredoxin (*dfx*) und die

Cytochrom-c-Peroxidase (*macA*) (Guo *et.al.*, 2021). Auch für *Geobacter uraniireducens* wurde beschrieben, dass er über diese ROS-detoxifizierenden Proteine verfügt (Mouser *et al.*, 2008). In Microarray-Analysen konnte gezeigt werden, dass dieser Organismus genau die vier oben genannten Gene bei einer Kultivierung mit einer Sauerstoffkonzentration von 5 % (N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>, 75:20:5) in der Gasphase in erhöhtem Maße exprimierte. Da diese Enzyme der Hauptgruppe der Superoxid-Oxidasen /-Reduktasen und -Dismutases zugehören (Afonso *et al.*, 2007), kann aus der Präsenz solcher Gene in *D. acetexigens* geschlossen werden, dass eine Kultivierung, auch ohne Anaerobenkammer und mit kurzem Sauerstoffkontakt möglich sein sollte (Guo *et al.*, 2021).

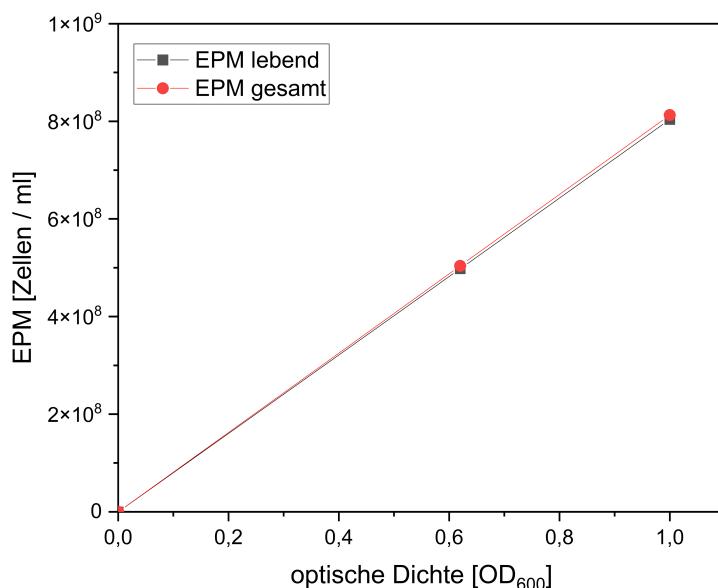
Diese Hypothese konnte im Rahmen dieser Arbeit wiederholt bestätigt werden: Nach in Kapitel 3.3 beschriebener planktonischer Kultivierung in BES-Medium (Kap. 2.2; Tab: 2; e<sup>-</sup>-Donor: 20 mM Acetat; e<sup>-</sup>-Akzeptor: 40 mM Fumarat), wurde der Organismus in jedem Experiment bei einem aeroben Milieu zentrifugiert, worauf eine Resuspension mit Hilfe einer Glaspipette folgte. Insgesamt wurden solche Kulturen für mindestens 30 Minuten einem Milieu mit Sauerstoff in der Umgebung ausgesetzt. Da ein kleiner Teil dieser resuspendierten Kultur immer für Rekultivierung des Organismus in Flüssigkultur genutzt wurde, kann gefolgert werden, dass kurze Kontakte des Organismus mit aeroben Flüssigkeiten und direkter Luft nicht zur Sauerstoffvergiftung führen. Somit kann die Kultivierung von *D. acetexigens* auch ohne besondere Ausstattung in einem Labor als recht unkompliziert betrachtet werden.

Wie in Abbildung 6 dargestellt, kann bei einer Flüssigkultivierung mit einer maximalen Wachstumsrate von ca.  $\mu_{\max} = 0,7 \text{ d}^{-1}$  gerechnet werden, die nach ca. 4,5 Tagen erreicht wird. In der Abbildung ist die optische Dichte in Abhängigkeit der Kultivierungszeit aufgetragen. Da *D. acetexigens* somit nach etwa 4 – 5 Tagen eine maximale Verdopplungsrate von  $t_{d\max} = 0,987 \text{ d}$  erreicht kann die, von Katuri *et al.* (2020) und Sapireddy *et al.* (2021) beschriebene Empfehlung einer vier-tägige Vorkultivierung von *D. acetexigens* vor Inkulation von bioelektrochemischen Systemen bestätigt werden.



**Abb. 6: Wachstumskurve von *D. acetexigens* in planktonischer Flüssigzellkultur in anaerobisiertem BES-Medium.**  
Zeitpunkt 0 entspricht dem Inkulationszeitpunkt aus einer flüssigen Vorkultur (5 % v/v).

Die Autoren Katuri *et al.* und Sappireddy *et al.* haben die Anzahl lebender Zellen pro Volumen als Parameter zur Beschreibung der Zelldichte in Flüssigkultur und der Definition der inkulierten Zellmenge genutzt. In dieser Arbeit wurde jedoch die optische Dichte OD<sub>600</sub> gewählt. Um eine Einschätzung über das Verhältnis lebender zur gesamten Zellmenge von *D. acetexigens*-Flüssigkulturen nachzuweisen und eine Vergleichbarkeit mit oben genannten Publikationen zu ermöglichen, wurde die Korrelation dieser Parameter bestimmt (vgl. Kap. 3.6.3). Dabei wurde die Zellkonzentration einer *D. acetexigens* Flüssigkultur mittels Durchflusszytometrie (Kap. 3.6.3) in einer Verdünnungsreihe ermittelt. Das Ergebnis ist in Abbildung 7 dargestellt. Hier ist die detektierte Zellzahl pro Volumen (Zellen/mL) (Ereignisse pro Messungseinheit, EPM) gegen die optische Dichte (OD<sub>600</sub>) der analysierten Flüssigkultur von *D. acetexigens* aufgetragen. Mittels Live-Dead-Fluoreszenzfärbung wurde bestimmt, welcher Anteil der erfassten Gesamtzellzahl (dargestellt durch rote Kreise, Abb. 7) aus lebenden Zellen besteht (dargestellt durch schwarze Quadrate, Abb. 7).



**Abb. 7: Korrelation zwischen Lebend- und Gesamtzellzahl, gemessen mit Durchflusszytometrie, und der mit dem Photometer gemessenen optischen Dichte von *D. acetexigens* (OD<sub>600</sub>).** In Rot sind die Gesamtzellzahlen (Ereignisse pro Messungseinheit, EPM), in Schwarz die bioinformatisch herausgelesenen Lebendzellzahlen abgebildet.

Der Anteil der lebenden Zellen an der Gesamtzellzahl betrug nach einer sieben-tägigen Kultivierung 98,93 % ± 1,37 %. Dies spricht dafür, dass auch nach Erreichen der stationären Phase in Flüssigkulturen (vgl. Abb. 6) *D. acetexigens* noch als Inkubum für bioelektrochemische Experimente genutzt werden kann.

Um einen direkten Vergleich mit den Publikationen von Katuri *et al.* (2020) und Sappireddy *et al.* (2021) zu ermöglichen, wurden die inkulierten Zellzahlen pro Volumen sowie das anodische Potential und die maximale Stromdichte in bioelektrochemischen Systemen, die mit Monokulturen von *D. acetexigens* arbeiteten, in Tabelle 10 aufgeführt. Die optische Dichte wurde basierend auf der Korrelation zwischen der Anzahl lebender Zellen und der spezifischen optischen Dichte ermittelt (vgl. Abb. 7).

**Tab. 10:** Inokulierte Lebendzellzahl und optische Dichte ( $OD_{600}$ ), anodisch angelegtes Potential und maximale Stromdichte ( $J_{max}$ ) bioelektrochemischer Kultivierungen von *D. acetexigens*. Die aufgetragene optische Dichte wurde aus der in Abb. 7 dargestellten Korrelation dieser Arbeit ermittelt.

Publikation	Lebendzellzahl (Zellen/mL)	optische Dichte ( $OD_{600}$ )	Potential	$J_{max}$
Sapireddy <i>et. al.</i> , 2021	$\sim 3 \times 10^8$	0,37	+ 100 mV vs. SHE	$\sim 9,6 \text{ A m}^{-2}$
Katuri <i>et. al.</i> , 2020	$\sim 2,9 \times 10^8$	0,35	+ 100 mV vs. SHE	$\sim 9,7 \text{ A m}^{-2}$

## 4.2 Bioelektrochemische Kultivierungen

Alle in dieser Arbeit dargestellten chronoamperometrischen Analysen der Organismen *Desulfuromonas acetexigens* und *Geobacter sulfurreducens* wurden in der mikrobiellen Fließzelle (Kap. 3.5.2) nach beschriebener Methode (Kap. 3.5.1) in, nach Sapireddy *et al.* adaptiertem MEC-Medium (Tab. 6, Kap. 3.2) durchgeführt (Sapireddy *et al.*, 2021). Davon abweichende Kultivierungsbedingungen werden an gegebener Stelle erläutert. Zur Analyse der Biofilmmorphologie wurden OCT-Aufnahmen angefertigt (Kap. 3.7) und nach den in Kapitel 3.7.1 beschriebenen Methoden ausgewertet. Um die bioelektrochemischen Experimente zu validieren und die Bakterien als einzige Katalysatoren der Stromproduktion zu identifizieren, wurde eine Negativkontrolle durchgeführt. Hierbei wurde die Fließzelle bei den oben beschriebenen Bedingungen für acht Tage betrieben, jedoch nicht mit Bakterien inkuliert. Das Ergebnis ist im Anhang in Abb. S2 dargestellt. Erkennbar ist, dass es ohne Inkulation weder zu einem Substratabbau, einer Biofilmentwicklung, noch einem Anstieg der Stromdichte gekommen ist. Dieses Ergebnis kann als Nachweis der bioelektrochemischen Katalyse gewertet werden. Ebenso weist diese Negativkontrolle auf eine geringe Kontaminationsgefahr durch EAMs (Kap. 2.1) hin, weshalb die in dieser Arbeit genutzte MEC als ein geschlossenes und steriles System erachtet werden kann (Hackbarth *et al.*, 2020).

In mehreren Versuchsreihen wurden die Biofilmbildung und Umsatzleistung nach monokultureller Inkulation der Zielorganismen (*D. acetexigens* bzw. *G. sulfurreducens*) mit unterschiedlichen Startzelldichten ( $OD_{600}$  von 0,1 – 0,35) über Zeiträume von 10 bis 38 Tagen analysiert. Im ersten Teil dieses Unterkapitels (Kap. 4.2.1 und Kap. 4.2.2) wird auf die chronoamperometrischen Kultivierungen von *D. acetexigens* eingegangen, im zweiten Teil auf *G. sulfurreducens* (Kap. 4.2.3 & 4.2.4). Hierbei werden sowohl die Biofilmbildung, die Biofilmmorphologie, sowie der Einfluss beider Parameter auf die generierte Stromdichte analysiert. Im dritten Abschnitt (Kap. 4.2.5) wird die laterale Biofilmmorphologie der Organismen miteinander verglichen. Ein Überblick über alle durchgeführten Experimente, sowie deren Benennung in dieser Arbeit ist in Tabelle 11 gegeben.

**Tab. 11:** Übersicht über die in diesem Projekt durchgeführten bioelektrochemischen Kultivierungen in der Fließzelle als mikrobielle Elektrolysezelle. Dargestellt sind alle in dieser Arbeit präsentierten bioelektrochemischen Kultivierungen, mit Angabe des jeweils angelegten Anodenpotentials, der gegebenen Betitelung sowie der inokulierten Zelldichte. Das zugehörige Kapitel ist auf der rechten Seite der Tabelle ersichtlich. Die ersten drei Buchstaben (Kürzel) der Betitelung verweisen auf den kultivierten Organismus, die nachfolgende Zahl kennzeichnet die Versuchsreihe, Duplikate von Versuchen erhalten den Zusatz A bzw. B.

Bakterienstamm	anodisches Potential	Betitelung	Zelldichte (OD <sub>600</sub> )	Kapitel
<i>D. acetexigens</i>	-100 mV; 0 mV; + 100 mV vs. SHE	Des1	0,1	4.2.1
	0 mV vs. SHE	Des2A	0,15	4.2.1
	0 mV vs. SHE	Des2B	0,15	4.2.1
	0 mV vs. SHE	Des3A	0,35	4.2.1
	0 mV vs. SHE	Des3B	0,35	4.2.1
	0 mV vs. SHE	Des4	0,12	4.4
<i>G. sulfurreducens</i>	0 mV vs. SHE	Geo1A	0,35	4.2.3
	0 mV vs. SHE	Geo1B	0,1	4.2.3

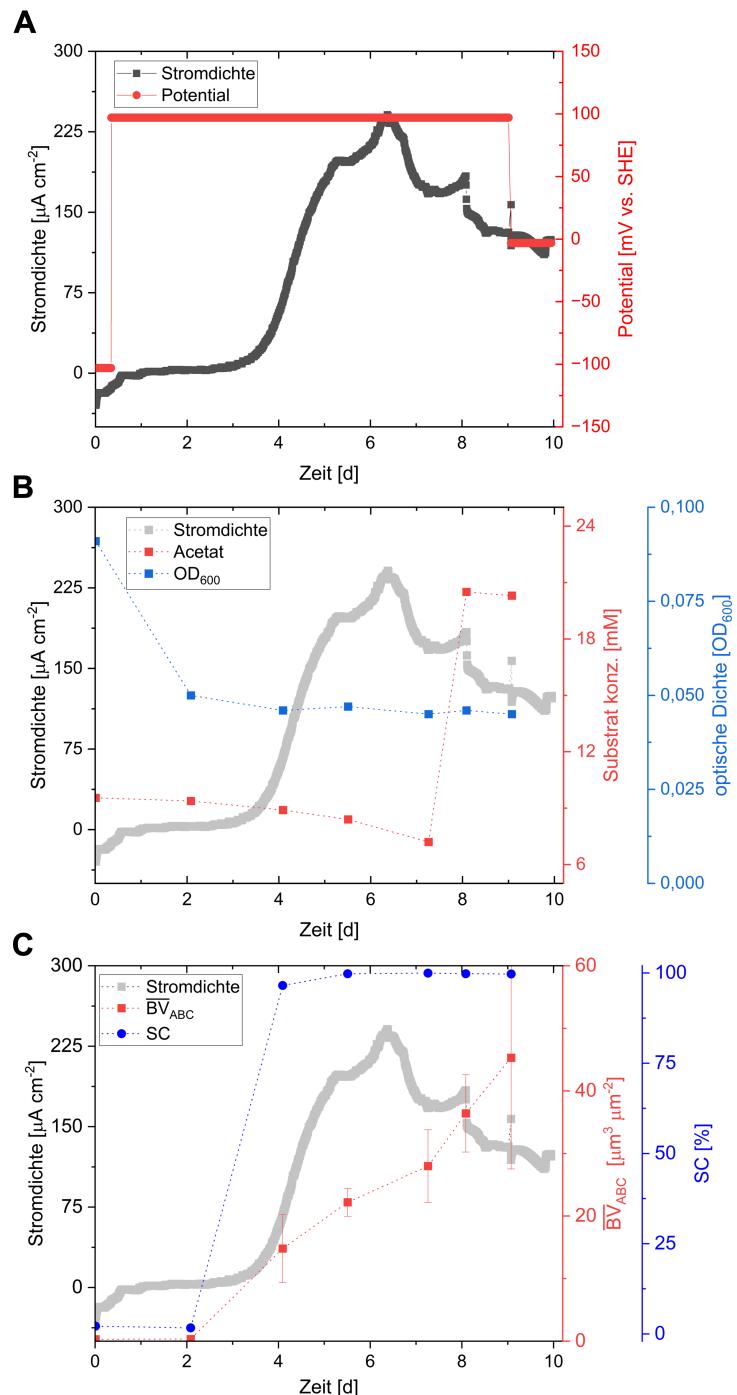
## 4.2.1 Bioelektrochemische Kultivierung von *D. acetexigens*

### Chronoamperometrische Analyse bei unterschiedlichen anodischen Potentialen

Des1: +100 mV vs. SHE, OD<sub>600</sub> = 0,1

In der ersten chronoamperometrischen Analyse (CA; Des1) sollten die elektrochemischen Eigenschaften, sowie das Wachstumsverhalten eines *D. acetexigens* Biofilms bei unterschiedlichen angelegten anodischen Potentialen analysiert werden. Die Methodik wird im Detail in Kapitel 3.5.1 beschrieben. Die Zelldichte zur Inbetriebnahme der MEC wurde auf eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,1 eingestellt und in das MEC-Medium (Kap. 3.4) vor Zugabe des Mediums in die Fließzelle inokuliert. Diese Zelldichte wurde gewählt, um die OCT-Daten nicht durch ein zu starkes Hintergrundsignal zu beeinträchtigen (Hackbarth *et al.*, 2023; Knoll *et al.*, 2023). In diesem Medium wurde der *D. acetexigens* Monokultur 10 mM Acetat als einzige Energiequelle zur Verfügung gestellt. Als weitere kohlenstoffhaltige Substanz wurde der pH-Puffer HEPES mit einer Konzentration von 25 mM gewählt, da dieser Puffer zuvor in vergleichbaren Reaktoren zur Biofilmkultivierung erfolgreich verwendet wurde (Hackbarth *et al.*, 2023). Der im HEPES enthaltene Kohlenstoff kann von Bakterien nicht als Kohlenstoffquelle genutzt werden, weshalb dieser pH-Puffer als inert beschrieben wurde (Ugwu & Apte, 2004). Der pH-Wert wurde auf 7,25 eingestellt. Die Anode wurde mit einem Potential von -100

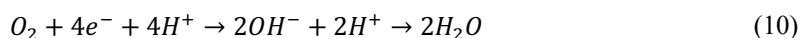
mV vs. SHE (Kap. 3.5.1) und nach 24 h mit einem Potential von + 100 mV vs. SHE polarisiert. Acht Tage nach Inokulation wurde ein Potential von 0 mV vs. SHE angelegt. In unterschiedlichen Zeitintervallen von 1 – 3 Tage wurde die Biofilmmorphologie mittels der OCT visualisiert und mittels Bildanalyse quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 A–C dargestellt.



**Abb. 8: Bioelektrochemische Kultivierung Des1 von *D. acetexigens* bei unterschiedlichen angelegten Potentialen.**

**A:** Darstellung des Verlaufs des anodisch angelegten Potentials und der Stromdichte von Des1. **B:** Darstellung der Substratkonzentration und der optischen Dichte in der Bulkphase. **C:** Darstellung der Biofilmentwicklung. Die zur Charakterisierung der Biofilmmorphologie genutzten Parametern sind der gemittelten Bedeckungsgrad der Anode mit Biofilm (*SC, substratum coverage*) sowie das mittlere Biovolumen ( $\overline{BV}_{ABC}$ ), welche an den drei Aufnahmepositionen (A, B und C) bestimmt wurden.

Zu Beginn der Kultivierung wurde an die Anode ein Potential von – 100 mV vs. SHE angelegt (Abb. 8A), da die Stromdichte zu Beginn des Experiments im negativen Bereich startet. In dieser Zeit fließen Elektronen von der Gegenelektrode zur Arbeitselektrode, was zu einem Umpolen der Elektroden führt. Dies ist erfahrungsgemäß auf einen im Medium vorhandenen Restsauerstoffgehalt zurückzuführen. Durch die umgepolten Arbeits- und Gegenelektroden kommt es zu einem Abbau, dieses Sauerstoffs nach folgender Redoxreaktion (10).



Je negativer das Potential ist, desto mehr Elektronen fließen bei umgepolten Elektroden zur Arbeitselektrode, woraus eine schnellere Sauerstoffreduktion resultiert. Die Stromdichte stieg somit innerhalb von 24 h von -75 µA cm<sup>-2</sup> auf 0 µA cm<sup>-2</sup>. Zu diesem Zeitpunkt wurde das anodische Potential auf + 100 mV vs. SHE angehoben, da mehrere Publikationen bei diesem Anodenpotential hohe Stromdichten von *D. acetexigens* Biofilmen beschreiben (Katuri *et al.*, 2017; Katuri *et al.*, 2020; Sapireddy *et al.*, 2021).

Nach ca. 3,4 Tagen konnte ein Anstieg der Stromdichte festgestellt werden, der nach 6,5 Tagen einen maximalen Wert von 241 µA cm<sup>-2</sup> erreichte. Dies ging mit einem Absinken der Substratkonzentration von 9,55 mM Acetat auf 7,2 mM einher. Nach acht Tagen wurde die Acetatkonzentration auf ca. 20,5 mM erhöht, worauf ein weiterer Substratabbau von 0,2 mM folgte. Dem Erhöhen der Acetatkonzentration folgt allerdings auch ein Einbruch der Stromdichte um ca. 54 µA cm<sup>-2</sup> (von 184 µA cm<sup>-2</sup> auf 130 µA cm<sup>-2</sup>) innerhalb von 10 Stunden. Allerdings muss erwähnt werden, dass das in Des1 zugegebene Acetat vor der Zugabe nicht anaerobisiert wurde, sodass eine geringe Menge an Sauerstoff mit in das System eingetragen wurde, was eine Beeinträchtigung des Biofilms zur Folge haben könnte. Im Übrigen könnte die abgesunkene Stromdichte auch auf eine überschrittene Substrattoleranz von *D. acetexigens* zurückzuführen sein. Sapireddy *et al.* zeigten, dass sich die maximale Stromdichte in monokulturell betriebenen MECs mit *D. acetexigens* bei einer Acetatkonzentration von ca. 14 mM Acetat einstellt. Bei 20 mM sind Abnahmen der maximalen Leistung von etwa 15 % beschrieben worden (Sapireddy *et al.*, 2021).

Neun Tage nach Start des Experiments wurde das anodische Potential auf 0 mV vs. SHE reduziert. In der Literatur ist bisher noch keine Beschreibung von monokulturellen *D. acetexigens* Biofilmen auf Anoden bei einem solchen Potential zu finden. Somit sollte das Absenken des Potentials zeigen, ob *D. acetexigens* die Anode auch bei diesem Potential noch effektiv als Elektronenakzeptor nutzen kann. Hintergrund ist, dass bei 0 mV vs. SHE weniger Energie von dem Potentiostat in das System eingebracht wird, was eine industriennahe Anwendung kostengünstiger machen würde. Erkennbar ist, dass sich der vorher schon bestehende Abwärtstrend der Stromdichte fortsetzt, allerdings kein starker Einbruch der Stromdichte detektiert wurde.

In Abbildung 8B ist ersichtlich, dass die optische Dichte innerhalb von zwei Tagen von  $OD_{600} = 0,09$  auf  $OD_{600} = 0,05$  abgesunken ist und sich auf diesem Niveau bis zum Ende des Versuches hielt. Da die optische Dichte erfahrungsgemäß stabil bleibt, wenn Zellen von der planktonischen Phase in ein Biofilmwachstum auf der Anode übergehen, war es überraschend, dass sich die Zelldichte innerhalb eines Tages nahezu halbierte. Dies kann durch einen fehlenden Rührfisch erklärt werden, sodass das Medium im Medientank nicht durchmischt wurde. Nach dem Abbruch des Versuchs wurden sedimentierte Zellen am Boden des Medientanks gefunden.

Abbildung 8C zeigt die Stromdichte, das mittlere Biofilmvolumen  $\overline{BV}_{ABC}$  mit Standardabweichung, sowie den Bedeckungsgrad  $SC$  über die Kultivierungszeit (vgl. Kap. 3.7.1).  $\overline{BV}_{ABC}$  steigt innerhalb von 9 Tagen auf  $45 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$  ( $\pm 17 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$ ), während die Oberfläche der Anode 5,16 Tage nach Inokulation komplett besiedelt wurde ( $SC = 100\%$ ). Die höchste Stromdichte wird in diesem Experiment (Des1) bei einem mittleren Biofilmvolumen von  $25 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$  ( $\pm 4 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$ ) erreicht. Auch konnte festgestellt werden, dass kurz nach einer  $SC$  von ca. 100 % die Stromdichte in einen abfallenden Trend gerät. Eine tiefergehende Analyse des Einflusses der Oberflächenbedeckung sowie des Biofilmvolumens und der mittleren Biofilmdicke auf die Stromdichte findet sich in Kapitel 4.2.2.

In diesem Experiment konnte aus dem Substratabbau und der gemessenen Stromdichte eine Coulomb'sche Effizienz ( $CE$ ; engl. *coulombic efficiency*; Kap. 3.5.1) von  $0,956 \pm 0,032$  berechnet werden. Dieser Wert liegt in einem erwarteten Bereich, da bei anaerobem chemolithoheterotrophen bakteriellen Wachstum meist nur 5 - 10 % des organischen C-Substrates für den Biomasseaufbau genutzt werden, da die Energieausbeute aus dem katabolen Kohlenstoffabbaus vergleichsweise gering bleibt (G. Fuchs, 2022). So wurde von Moscoviz *et al.* auch bei *Geobacter sulfurreducens* nachgewiesen, dass er in anaeroben Systemen nur ca. 10 % der Elektronenäquivalenten bei einer Acetatoxidation in den Biomasseaufbau einfließen lassen kann. Dies wird mit der maximalen ATP-Ausbeute ( $Y_{ATP/Acetat} = 2$ ) aus der Oxidation eines Moleküls Acetat begründet, welche vergleichsweise gering ist und folglich zu einem verstärkten Acetatabbau führt (Moscoviz *et al.*, 2017). Bei einer  $CE$  von ca. 0,95 werden also 95 % des Substrates in katabolen Stoffwechselreaktionen zu dem Endprodukt  $\text{CO}_2$  oxidiert, und die daraus gewonnenen Elektronen auf die Anode übertragen. 5 % des Kohlenstoffs kann mithilfe der im Katabolismus generierten Energie in den Zellaufbau bzw. die Bildung von extrazellulären polymeren Substanzen eingehen (Korth *et al.*, 2020). Die  $CE$  von unter 1 spricht für eine Nutzung von Acetat als einziger Kohlenstoff-, und Elektronenquelle (Engel *et al.*, 2019), weswegen eine Oxidation von kathodisch produziertem Wasserstoff als Elektronendonator ausgeschlossen werden kann (Sapireddy *et al.*, 2021; Katuri *et al.*, 2020; Guo *et al.*, 2021; Joshi *et al.*, 2021).

Im Laufe dieser Arbeit stellte sich heraus, dass in den bioelektrochemischen Kultivierungen Des3B (*D. acetexigens*) und Geo1B (*G. sulfurreducens*) Kontaminanten enthalten waren, wie die Sequenzierungen und Analysen der phylogenetischen Diversität (Details siehe Kap. 3.4, Kap. 4.4) am Ende der Experimente zeigten. Da jedoch in allen Duplikat-Experimenten die gleichen Flüssigkulturen verwendet wurden, die alle 5 Tage rekultiviert und in neues Medium überimpft wurden, sollte in Des2AB, Des3AB und Geo1AB ebenso von einer mischkulturellen Biofilmentwicklung ausgegangen werden. Allerdings stellen *D. acetexigens* (Des2AB, Des3AB, Des4) und *G. sulfurreducens* (Geo1AB) in den analysierten Proben den Hauptbestandteil, sowie die einzige beschriebenen anodisch respirativen Bakterien der sequenzierten mikrobiellen Gemeinschaft dar. Somit kann die produzierte Stromdichte weitestgehend auf den Acetatabbau durch die eigentlichen Zielorganismen zurückgeführt werden.

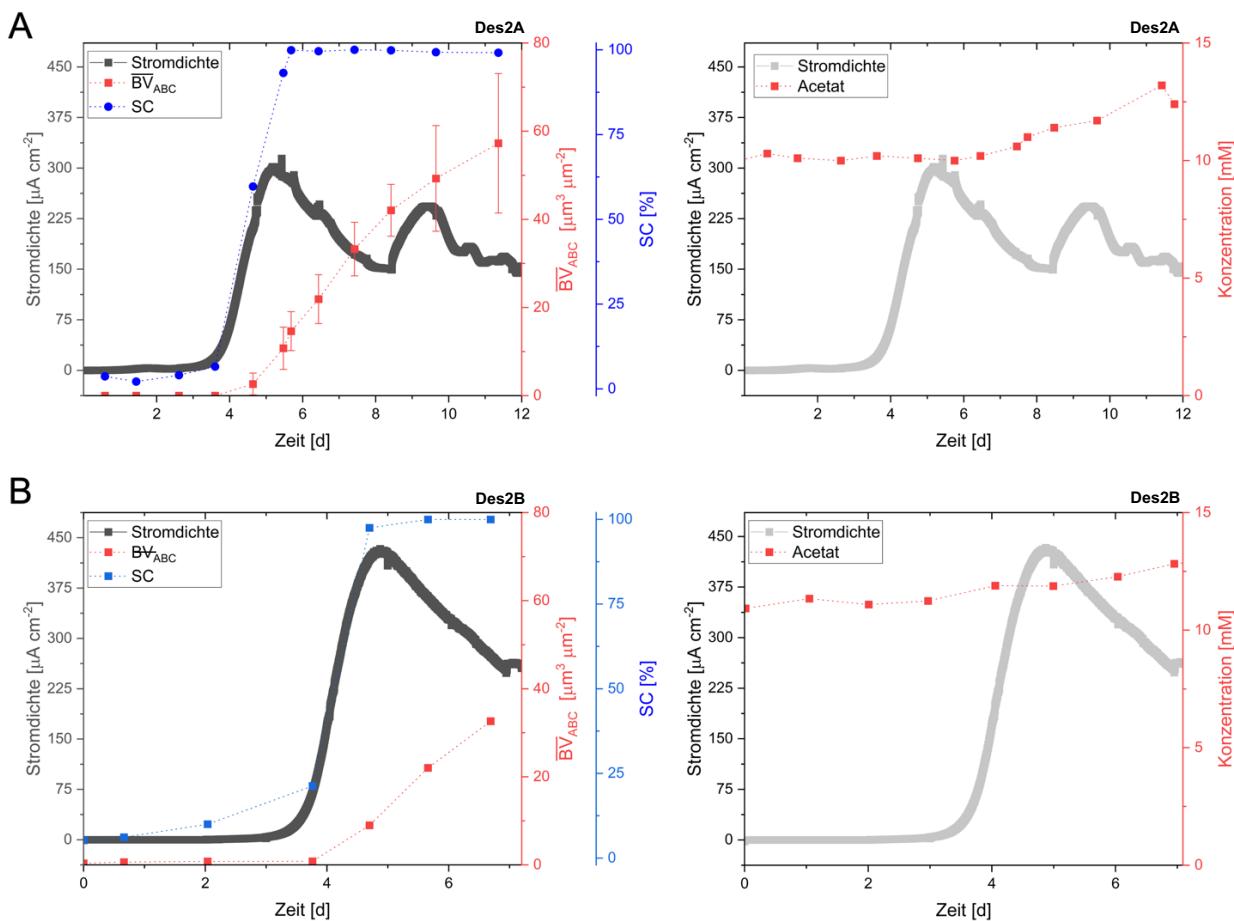
Auch wurde in allen Duplikaten eine Acetatproduktion nachgewiesen, die auf die Nutzung einer weiteren Kohlenstoffquelle zurückgeführt werden kann (Kap. 4.4). Somit konnte in allen folgenden Versuchsbeschreibungen des Kapitels 4.2 keine direkte *CE* oder Substratumsatzrate berechnet werden. Daher werden die Verläufe der Acetatkonzentrationen aller Duplikate (Des2AB, Des3AB und Geo1AB) zwar gezeigt, in diesen Kapiteln (4.2.2 – 4.2.5) wird aber nicht darauf eingegangen. Für die entsprechende Diskussion der Substratkonzentrationen, möglicher alternativer Kohlenstoffquellen sowie der mikrobiellen Zusammensetzung der eingesetzten Kulturen wird auf Kapitel 4.4 verwiesen.

### **Chronoamperometrische Analysen bei 0 mV vs. SHE**

In diesem Abschnitt werden vier chronoamperometrische Analysen von *D. acetexigens* in der Fließzelle bei einem angelegten Potential von 0 mV vs. SHE und einer initialen Zelldichte von  $OD_{600} = 0.15$  (Des2AB) bzw. 0,35 (Des3AB) präsentiert (vgl. Tab. 11).

#### Des2AB; $OD_{600} = 0,15$

In Abbildung 9 sind die Kultivierungen Des2A (Abb. 9A) und Des2B (Abb. 9B) gezeigt. Links sind jeweils das mittlere Biofilmvolumen, der mittlere Bedeckungsgrad und die Stromdichte dargestellt, rechts die Substratkonzentration. Für das mittlere Biofilmvolumen sind die Standardabweichungen der OCT-Daten abgebildet. Beide Experimente wurden mit einer  $OD_{600} = 0,15$  inkuliert. Als Zeitpunkt 0 wurde der jeweilige Inkulationszeitpunkt gewählt.



**Abb. 9: Bioelektrochemische Kultivierung von *D. acetexigens* mit einer Start-OD<sub>600</sub> von 0,15 bei einem anodischen Potential von 0 mV vs. SHE.** Dargestellt ist der Verlauf der Stromdichte, des mittleren Biovolumens ( $\overline{BV}_{ABC}$ ), des Bedeckungsgrades (SC) (links abgebildet) sowie der Acetatkonzentration (rechts abgebildet) über die Kultivierungszeit von 12 Tagen (Des2A) bzw. 7 Tagen (Des2B). Es wurde jeweils mit einer Start-OD<sub>600</sub> von 0,15 inkokuliert. Die Duplikat-Versuche Des2A (A) bzw. Des2B (B) sind oben bzw. unten gezeigt.

In beiden Experimenten startet der exponentielle Anstieg der Stromdichte ca. 3,5 Tage nach Inkulation auf Maximalwerte von  $301,9 \mu\text{A cm}^{-2}$  (Des2A) und  $425 \mu\text{A cm}^{-2}$  (Des2B). Ähnlich wie im zuvor beschriebenen Experiment erreicht die Anode kurz nach dem Erreichen der maximalen Stromdichte einen Bedeckungsgrad von 100 %, worauf eine Abnahme der Stromdichte folgte.

In Experiment Des2A (Abb. 9A) wurde nach 8,4 Tagen die mittlere Strömungsgeschwindigkeit der Flüssigphase oberhalb der Anode (vgl. Abb. 5) für 48 h von  $\bar{v} = 1,5 \text{ cm s}^{-1}$  (Kap. 3.5.1) auf  $\bar{v} = 2,25 \text{ cm s}^{-1}$  angehoben, um den Einfluss des somit erhöhten Stoffübergangs auf die Stromdichte zu beobachten. Ersichtlich ist ein erneuter Aufwärtstrend der Stromdichte von  $149 \mu\text{A cm}^{-2}$  auf  $243 \mu\text{A cm}^{-2}$ . Nach 9,5 Tagen nahm die Stromdichte erneut ab und wies nach 12 Tagen Kultivierung noch  $144 \mu\text{A cm}^{-2}$  auf. Erfährt ein zu dem Zeitpunkt bereits substratlimitiertes Biofilmsystem einen erhöhten Stoffübergang, erhöht sich auch die Substratversorgung der Bakterien im Biofilm, woraufhin mehr Acetat in kürzerer Zeit oxidiert und die Elektronen auf die Anode abgegeben werden können (vgl. Kap. 1.2). Dies könnte den Aufwärtstrend der Stromdichte in der Zeit zwischen 8,5 und 9,5 Tagen erklären. Da sich nach der Erhöhung der Strömungsgeschwindigkeit das mittlere Biofilmvolumen von

$42 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2} \pm 5,9 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$  auf final  $57,25 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2} \pm 15,8 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$  erhöht hatte, folgt daraus aber wiederum eine erschwerete Abgabe der Elektronen auf die Anode. Somit konnte einen Tag nach Erhöhen der Diffusionstiefe eine Kompensation der dadurch begünstigten katabolen Stoffwechselrate durch eine erhöhte Distanz zur Anode als Elektronenakzeptor beobachtet werden.

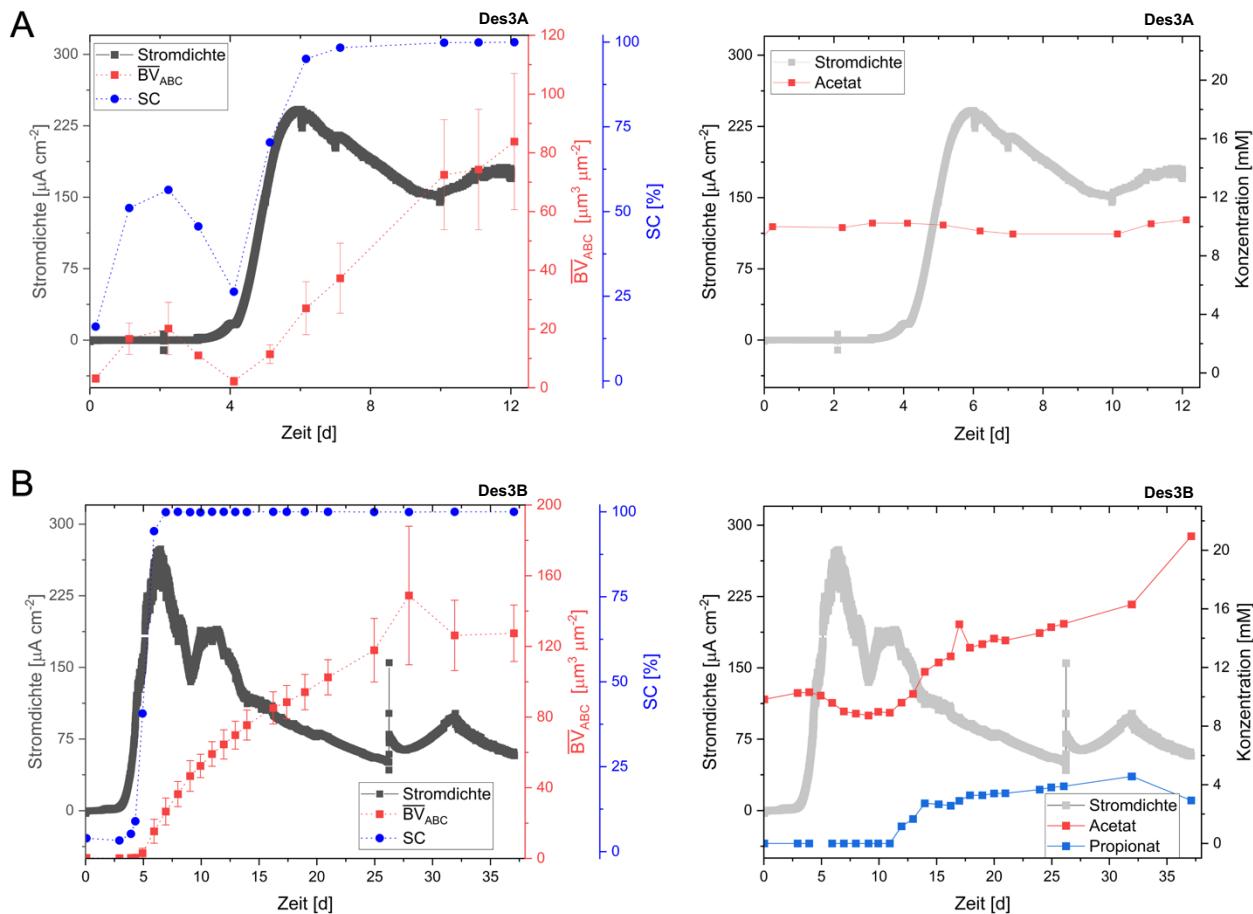
Zum Zeitpunkt der maximalen Stromdichte liegt das mittlere Biofilmvolumen von Des2A und Des2B bei ca.  $10 \pm 1,1 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$ . Eine ausführliche Erörterung des Zusammenhangs zwischen Biofilmmorphologie und der Stromdichte folgt in Kapitel 4.2.2.

#### Des3AB; OD<sub>600</sub> = 0,35

In Abbildung 10 sind das mittlere Biofilmvolumen, der Bedeckungsgrad der Anode, die Stromdichte, sowie die Substratkonzentration über die Zeit von Experiment Des3A (Abb. 10A) und Experiment Des3B (Abb. 10B) aufgetragen. Beide Experimente wurden mit einer Zelldichte von  $\text{OD}_{600} = 0,35$  inkuliert. Hier sollte der Einfluss der im Vergleich zu Des2AB erhöhten Zellmenge bei der Inkulation auf die Biofilmentwicklung und die entsprechende Stromdichte analysiert werden. Dem Medium wurde 10 mM Acetat als einziger Elektronendonator und Kohlenstoffquelle zugefügt.

In dieser Versuchsreihe wurden maximale Stromdichten zwischen  $246 \mu\text{A cm}^{-2}$  (Des3A) und  $260 \mu\text{A cm}^{-2}$  (Des3B) gemessen (Abb. 10), wobei der exponentielle Anstieg der Stromdichte wie im Duplikat Des2 (Des2A, Abb. 9A; Des2B, Abb. 9B) ca. 3,5 Tage nach Inkulation startet.

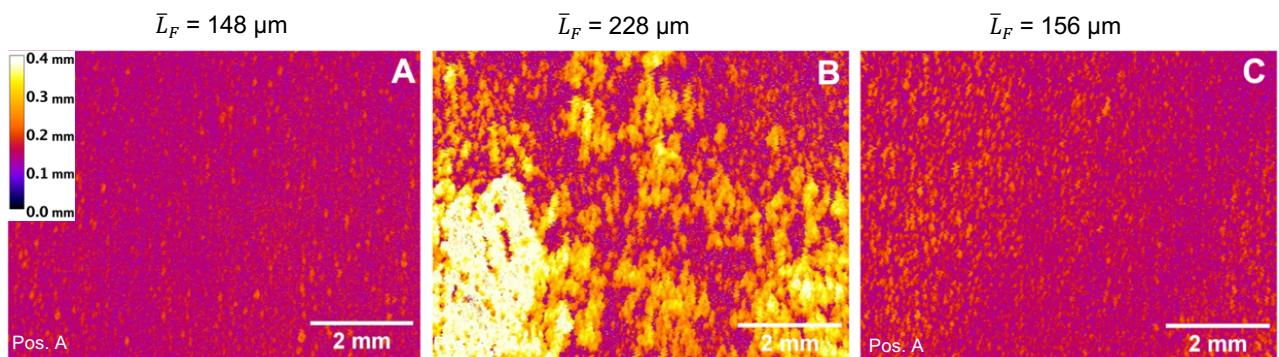
In Des3A konnte zwischen Tag 3 und Tag 10 eine Abnahme der Acetatkonzentration nachgewiesen werden, welche bis Tag 12 allerdings wieder zunahm. In der dreimal so lang andauernden Kultivierung Des3B konnte ebenfalls zunächst eine Acetatabnahme gemessen werden, nach zehn Tagen kam es jedoch zu einer deutlichen Zunahme auf final 21 mM Acetat nach 37 Tagen Kultivierungszeit (vgl. Kap. 4.4, Abb. 25).



**Abb. 10: Bioelektrochemische Kultivierung von *D. acetexigens* mit einer Start-OD<sub>600</sub> von 0,35 bei einem anodischen Potential von 0 mV vs. SHE.** Dargestellt ist der Verlauf der Stromdichte, des Biovolumens ( $\overline{BV}_{ABC}$ ), des Bedeckungsgrades (SC) (links abgebildet) sowie der Konzentration von Acetat bzw. Propionat (rechts abgebildet) über die Kultivierungszeit (Des3A: 12 Tage, Des3B: 37 Tage). Es wurde jeweils mit einer Start-Od<sub>600</sub> von 0,35 inkuliert. An der Anode wurde ein Potential von 0 mV vs. SHE angelegt. Die Duplikat-Versuche Des2A (A) bzw. Des2B (B) sind oben bzw. unten gezeigt.

Im Gegensatz zu allen anderen Experimenten erhöht sich der Bedeckungsgrad in Des3A schon vor dem exponentiellen Anstieg der Stromdichte auf bis zu 50 %. Auch ein Biofilmvolumen von  $20 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$  wurde bereits einen Tag nach Inkulation detektiert. Da der Bedeckungsgrad jedoch am vierten Tag nach Inkulation wieder auf 25 % abgesunken war und sich auch das Biofilmvolumen wieder auf  $3 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$  verringerte, kann darauf geschlossen werden, dass es sich in diesem Zeitraum nicht um eine tatsächliche Biofilmbildung handelte. Vielmehr könnte es sich hierbei um ein Resultat der Inkulation mit einer nicht komplett homogen verteilten Zellsuspension handeln. Da nur ca. 7 mL einer stark konzentrierten Bakteriensuspension inkuliert wurden, besteht hierbei die Möglichkeit der Zellaggregation, wobei die Zellklumpen eine kurzzeitige Adhäsion an Oberflächen des Systems eingehen können. Bei der konstanten Rezirkulation bei  $\bar{v} = 1,5 \text{ cm s}^{-1}$  kann von einer langsamen Homogenisierung der Zellen im Medium und Auflösung der Zellagglomerate ausgegangen werden. Ein weiterer Grund einer solchen Zellagglomeration könnte der Einfluss des pH-Wertes von anfangs 7,3 auf *D. acetexigens* sein. Laut Finster *et al.*, tendiert *D. acetexigens* in planktonischer Form bei einem pH-

Wert zwischen 7,0 - 7,3 zur Zellaggregationen und z. B. Adhäsion an Sedimentpartikel (Finster *et al.*, 1994). Zwar wurde die Pufferkapazität des vorher genutzten HEPES pH-Puffer (genauere Beschreibung Kap. 3.3) berechnet, jedoch ist der pH-Wert in den dargestellten Experimenten auf 6,8 (nach 12 Tagen; Des3A) bzw. 6,6 (nach 27 Tagen; Des3B) abgesunken. An Tag 26,5 von Des3B wurde der pH-Wert wieder auf 7,3 angehoben (2 mL; 0,1 M NaOH). Auffällig ist, dass das mittlere Biofilmvolumen einen Tag nach pH-Adjustierung einen kurzzeitigen Ausschlag nach oben zeigt (Tag 27,9). Dieses Phänomen ist der Zugabe der Base durch die Swagelok-Kupplung (Abb. 4A) zuzuschreiben. Diese Kupplung befindet sich im Zulaufrohr, kurz vor dem Fließzellenkanal. Somit floss die Base in konzentrierter Form durch den Fließzellenkanal, bevor es im Medientank zu einer Verdünnung und Homogenisierung kam. Durch diese lokale massive Anhebung des pH-Wertes kam es vermutlich zu einer Ausfällung verschiedener Salze; am wahrscheinlichsten erscheint eine Ausfällung von Magnesiumhydroxid. Eine lichtmikroskopische Darstellung der ausgefallenen Salze ist im Anhang (Abb. S3) ersichtlich. Diese Salze konnten sich kurzzeitig auf dem Biofilm ablagern und waren in der OCT-Datengenerierung und Auswertung nicht von der Biomasse zu unterscheiden. In Abbildung 11 sind drei Höhenprofile des Biofilmes dargestellt: A: Tag 25 (1,3 Tage vor pH-Wertanpassung), B: Tag 28 (1,7 Tage nach pH-Wertanpassung) und C: Tag 32 (5,6 Tage nach pH-Wertanpassung). Die OCT-Daten der dargestellten Höhenprofile wurden alle an der OCT-Aufnahmeposition A, (Kap. 3.5.1; Abb. 21) generiert. Hierbei wurde eine Biofilmdicke von 400 µm als Maximum quantifiziert.

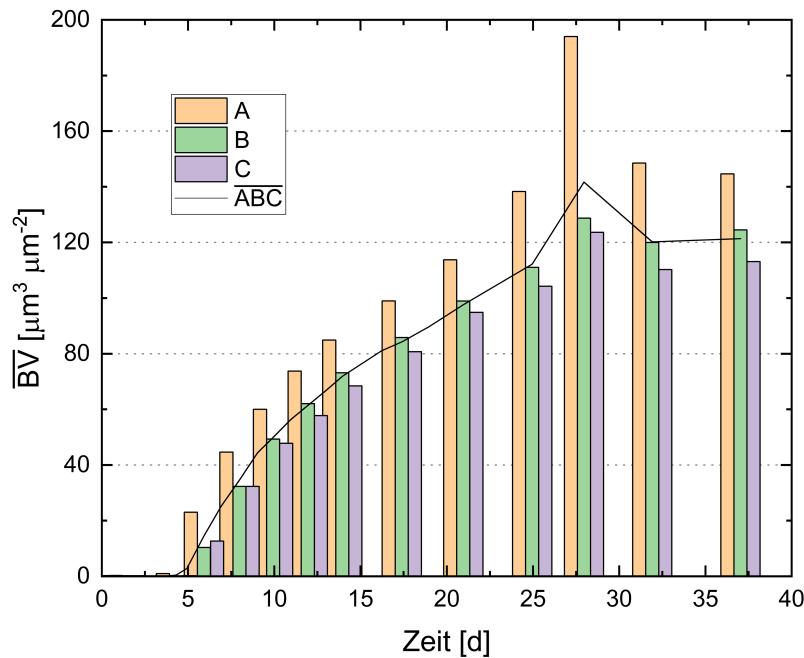


**Abb. 11: Höhenprofile (8 x 6 mm; B x L) der anodisch akkumulierten Biomasse um die Zeit der pH-Wertanpassung in Des3B.** Alle dargestellten Höhenprofile wurden an der OCT-Position A aufgenommen (Kap. 3.5.1; Abb. 21). Über den Höhenprofilen ist die jeweilige mittlere Biofilmdicke ( $\bar{L}_F$ ) aufgetragen. **A:** Höhenprofil, aufgenommen an Tag 25 nach Inokulation **B:** Höhenprofil, aufgenommen an Tag 28 nach Inokulation. **C:** Höhenprofil, aufgenommen an Tag 32 nach Inokulation.

Etwa zwei Tage nach Zugabe der Base (Tag 28) war eine Zunahme der mittleren Biofilmdicke um 80 µm erkennbar, welcher in den nächsten Tagen jedoch wieder komplett auflöst wurde. An Tag 32 wurde wieder ein homogenes Höhenprofil ( $\bar{L}_F = 156 \mu\text{m}$ ) erreicht.

Um den Einfluss der lokalen Strömungsgeschwindigkeit (Hackbarth *et al.*, 2020) auf die Biofilmmorphologie von *D. acetexigens* darzustellen, wurden in Abb. 12 die spezifisch an jeder Aufnahmeposition (A, B und C; vgl. Kap. 3.5.1; vgl. Abb. 21) gemessenen mittleren Biofilmvolumina

gegen die Zeit nach Inokulation von Des3B abgebildet und durch Balken gekennzeichnet, die Farbskalierung ist in der Grafik aufgetragen. Das gemittelte Biofilmvolumen der drei Aufnahmepositionen ( $\overline{BV}_{ABC}$ ) ist als schwarze Linie zu erkennen.



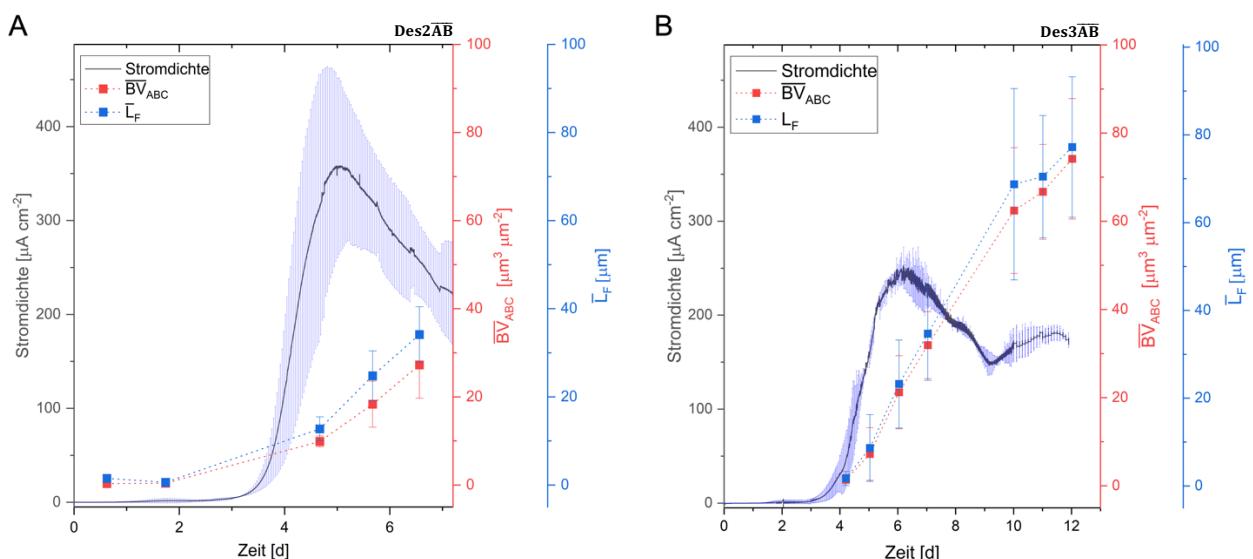
**Abb. 12: Vergleich des spezifischen Biofilmvolumens der *D. acetexigens* Des3B-Kultivierung an unterschiedlichen Positionen des Substratums.** Die dargestellten Biofilmvolumina wurden an den OCT-Aufnahmepositionen A, B und C (vgl. Kap. 3.5.1; vgl. Abb. 21; 8 mm x 6 mm; B x L) generiert.

Hierbei kann beobachtet werden, dass der Biofilm über den kompletten Zeitraum des Experiments einen Gradienten des Biofilmvolumens je nach Position auf der Anode aufweist. Das größte Biofilmvolumen kann an Position A, gefolgt von B und C festgestellt werden. Im Durchschnitt konnte bei Des3B an Position A ein mittleres Biofilmvolumen ( $\overline{BV}_A$ ) detektiert werden, welches etwa 19 % über dem gemittelten Biofilmvolumen aller drei Positionen  $\overline{BV}_{ABC}$  liegt. Die Biofilmvolumina  $\overline{BV}_B$  und  $\overline{BV}_C$  lagen im Durchschnitt etwa 9 % bzw. 11,2 % unter  $\overline{BV}_A$ . Zur Erörterung dieses Gradienten sollte das Geschwindigkeitsgefälle im Strömungsfeld der Fließzelle (Abb. 5; Kap. 2.5.2) betrachtet werden. Scheinbar kann *D. acetexigens* bei einer Strömungsgeschwindigkeit des Mediums von  $\bar{v} = 20 \text{ mm s}^{-1}$  an Position A ein höheres Biovolumen, als bei  $\bar{v} = 15 \text{ mm s}^{-1}$  (B) und  $\bar{v} = 10 \text{ mm s}^{-1}$  (C) ausbilden.

Um diese Hypothese zu unterstreichen ist im Anhang in Abb. S4 zusätzlich Vergleich der spezifischen Biofilmvolumina an den Positionen A, B und C (8 mm x 6 mm; B x L) von Versuch Des2A dargestellt. Auch hier ist ein ähnlicher Gradient des Biofilmvolumens entlang der Fließstrecke auf der Anode erkennbar.

## 4.2.2 Charakterisierung der Biofilmmorphologie von *D. acetexigens* und deren Einfluss auf die erzeugte Stromdichte

Um die Biofilmmorphologie von *D. acetexigens* umfassend zu charakterisieren und deren Einfluss auf die erzeugte Stromdichte zu untersuchen, wird in diesem Abschnitt der Zusammenhang des Biofilmvolumens, sowie der mittleren Biofilmdicke auf die Stromdichte analysiert. Hierfür wurde aus den Versuchsreihen Des2AB und Des3AB, welche mit einer Start OD<sub>600</sub> von 0,15 (Des2A, Des2B) bzw. 0,35 (Des3A, Des3B) inkuliert wurden die Mittelwerte  $\bar{BV}$ ,  $\bar{L}_F$ , sowie der Stromdichte gebildet und über die Kultivierungszeit nach Inkulation aufgetragen (Abb. 13). Das mittlere Biovolumen  $\bar{BV}$  ist mit roten Quadraten gekennzeichnet, die mittlere Biofilmdicke  $\bar{L}_F$  mit blauen Quadraten. Die Standardabweichung der Stromdichte ist in Hellblau dargestellt. Das Duplikat von Des2A und Des2B wird im Folgenden als Des2 $\overline{AB}$  betitelt, das Duplikat von Des3A und Des3B als Des3 $\overline{AB}$ . Genaue Beschreibungen dieser Experimente sind in Kapitel 4.2.1 ersichtlich. Des2 $\overline{AB}$  wird in Abb. 13A dargestellt, Des3 $\overline{AB}$  in Abb. 13B.



**Abb. 13: Darstellung der mittleren gemessenen Parameter der Biofilmmorphologie und Stromdichte der Duplikate Des2 $\overline{AB}$  und Des3 $\overline{AB}$  von *D. acetexigens* bei einem angelegten Potential von 0 mV vs. SHE.** Dargestellt sind die Mittelwerte der Stromdichte, des Biovolumens ( $\bar{BV}_{ABC}$ ), und der mittleren Biofilmdicke ( $\bar{L}_F$ ) über die Kultivierungszeit. Letztere richtet sich nach der Kultivierungsdauer des jeweils kürzeren Experiments. **A:** Mittelwerte des Duplikats Des2 $\overline{AB}$ , welches mit einer OD<sub>600</sub> von 0,15 inkuliert wurde. **B:** Mittelwerte des Duplikats Des3 $\overline{AB}$ , welches mit einer OD<sub>600</sub> von 0,35 inkuliert wurde.

Einen auffallenden Unterschied beider Duplikate stellt die gemittelte maximale Stromdichte  $\bar{J}_{max}$  dar. Nach ca. 5 Tagen wurde bei Des2 $\overline{AB}$  eine maximale Stromdichte ( $\bar{J}_{max}$ ) von 356  $\mu\text{A cm}^{-2}$  erfasst, während Des3 $\overline{AB}$  nach 6 Tagen eine maximale Stromdichte  $\bar{J}_{max}$  von 248  $\mu\text{A cm}^{-2}$  erreicht. Überschreiten die Biofilme der Duplikat-Kultivierung Des2 $\overline{AB}$  ein mittleres Biovolumen von  $10 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2} \pm 1,2 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$ , so folgt ein Einbruch der Stromdichte, während eine entsprechende

Abnahme bei Des3 $\overline{AB}$  erst bei Überschreitungen eines mittleren Biofilmvolumens von ca.  $27 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$  auftritt.

Beim Vergleich der gemittelten Biofilmdicken und Biofilmvolumina von Des2 $\overline{AB}$  und Des3 $\overline{AB}$  ist erkennbar, dass das mittlere Biofilmvolumen immer deutlich unter der mittleren Biofilmdicke liegt. Dies kann durch die Berechnung der mittleren Biofilmdicke im Vergleich zum Biofilmvolumen erklärt werden. Für die Berechnung des Biofilmvolumens werden alle Voxel eines C-Scans gezählt und mit der aufgenommenen Fläche multipliziert (näher nachzulesen in Kap. 3.7.1). Hierbei gehen nur Voxel in die Berechnung ein, welche aufgrund des Threshold nach Otsu (Otsu, 1979; Kap. 3.7.1) dem Biofilm zugeordnet wurden, unabhängig von der dreidimensionalen Lage des jeweiligen Voxels im gescannten Raum. Folglich werden keine Hohlräume und Lücken innerhalb eines Biofilmes mit in das Biofilmvolumen einbezogen (Wagner & Horn, 2017). Bei der mittleren Biofilmdicke hingegen haben Hohlräume oder nicht besiedelte Volumina unterhalb des obersten detektierten Biofilmvoxels keinen Einfluss auf die bestimmte Höhe. Dementsprechend wird für jeden A-Scan nur die Höhe dieses obersten Voxels bestimmt, unabhängig davon, ob sich darunter Voxel befinden, die der Wasserphase bzw. Hohlräumen im Biofilm zugeordnet wurden. Somit war zu erwarten, dass die mittlere Biofilmdicke leicht über dem Biofilmvolumen liegen sollte, da bei den meisten Biofilmsystemen von einer gewissen Porosität auszugehen ist (Wagner & Horn, 2017).

Ebenso wie die mittlere Stromdichte unterscheidet sich auch das Verhältnis der jeweiligen mittleren Biofilmdicke  $\bar{L}_F$  und des Biofilmvolumens  $\overline{BV}_{ABC}$  in Des2 $\overline{AB}$  und Des3 $\overline{AB}$ . Dieses Verhältnis wird nach folgender Formel (11) gebildet (Glasbey *et al.*, 1997; Picioreanu *et al.*, 1998):

$$V_t = \frac{\bar{L}_{F,t}}{\overline{BV}_{ABC,t}} \quad (11)$$

wobei  $V_t$  den prozentualen Quotienten der mittleren Biofilmdicke zum mittleren Biovolumen zum gleichen Zeitpunkt ( $t$ ) einer Kultivierung darstellt. Vergleicht man dieses Verhältnis der mittleren Biofilmdicke zum mittleren Biofilmvolumen beider Duplikate, so weist Des2 $\overline{AB}$  einen um 23 % höheren Quotienten  $\bar{L}_F/\overline{BV}$  zum Zeitpunkt  $J_{max}$  auf. Dies kann einerseits für eine höhere Porosität in Des2 $\overline{AB}$  sprechen (Picioreanu *et al.*, 2000), könnte aber auch auf eine unterschiedliche Rauheit der gemittelten Biofilmoberfläche zwischen den Duplikaten Des2 $\overline{AB}$  und Des3 $\overline{AB}$  hinweisen (Glasbey *et al.*, 1997; Muga *et al.*, 1995). Zur Beschreibung der Heterogenität eines Biofilmes kann außerdem der Rauheitskoeffizient  $R_a^*$  genutzt werden (Muga *et al.*, 1995; Wagner & Horn, 2017) (vgl. Kap. 3.7.1). Dabei gilt: Je kleiner der Wert von  $R_a^*$  ist, desto glatter ist die Oberfläche des Biofilms, während ein hoher Wert von  $R_a^*$  auf einen rauen oder sogar fleckigen Biofilm hinweist (Murga *et al.*, 1995; Picioreanu *et al.*, 1998). Wird  $R_a^*$  beider Duplikate verglichen, so weist Des2 $\overline{AB}$  beim Erreichen der maximalen Stromdichte eine ca. 70 % rauere Biofilmoberfläche ( $R_{a,Jmax}^* = 1,24 \pm 0,3$ ) auf als Des3 $\overline{AB}$  ( $R_{a,Jmax}^* = 0,73 \pm 0,15$ ).

Je höher die Partikellast in einem BES, desto höher sind ebenfalls die Scherkräfte, welche zu einer Abrasion des Biofilmes und somit zu einer homogeneren Oberfläche des Biofilms führen kann (vgl. Kap. 2.2) (Spormann, 2023). Somit könnten die unterschiedlichen Homogenitäten der Biofilmoberflächen mit dem Unterschied der jeweils inkulierten Zelldichte zusammenhängen (Des3 $\overline{AB}$ , OD<sub>600</sub> = 0,35; Des2 $\overline{AB}$ , OD<sub>600</sub> = 0,15). Da bei einer raueren Biofilmoberfläche von einer vergrößerten Substrataufnahmefläche des Biofilmes ausgegangen werden kann, könnte dies als Indiz der unterschiedlichen maximalen Stromdichten aufgeführt werden. Eine ausführliche Diskussion, ob aus dem Oberflächenprofil eines elektrochemisch aktiven Biofilmes auf die katalytische Effizienz geschlossen werden kann, findet sich in Kap. 4.2.5.

Etwa 3,5 Tage nach Inkulation zeigen beide Duplikate einen exponentiellen Verlauf der Stromdichte bis zu einem Maximum der gemittelten Stromdichte ( $\bar{J}_{max}$ ). Da die Duplikate jeweils mit unterschiedlichen Zelldichten inkuliert wurden (Des2 $\overline{AB}$  → OD<sub>600</sub> = 0,15; Des3 $\overline{AB}$  → OD<sub>600</sub> = 0,35) kann gefolgert werden, dass die zugegebene Zellmenge in dieser Fließzelle keinen Einfluss auf die Dauer der Adhäsionsphase des *D. acetexigens* Biofilmes hat. Nach dem Überschreiten von  $\bar{J}_{max}$  wäre auch ein Einbruch der mittleren Biofilmakkumulationsrate (vgl. Kap. 3.7.1) zu erwarten. Ein solcher Wendepunkt, an dem die Biofilmakkumulationsrate ( $BV^*_{ABC}$ ) ihr Maximum überschreitet und in einen Abwärtstrend gerät wird in der Elektrobiologie „Inflektionspunkt“ genannt. Er ist Ausdruck einer Veränderung des Biofilmwachstumsprozesses (Hackbarth *et. al.*, 2020). Somit definiert er sich als der Wendepunkt, an dem die Biofilmakkumulationsrate ( $BV^*_{ABC}$ ) ihr Maximum überschreitet und in einen Abwärtstrend gerät (Hackbarth *et. al.*, 2020). Um den Zusammenhang der morphologischen Biofilmentwicklung von *D. acetexigens* mit der gemittelten Stromdichte näher zu betrachten, ist in Abbildung 14 ein direkter Vergleich des mittleren Biofilmvolumens  $\overline{BV}_{ABC}$ , der mittleren Biofilmakkumulationsrate ( $\overline{BV}^*_{ABC}$ ), des Bedeckungsgrades (SC) und der aufgezeichneten Stromdichte von Des2A (Kap 3.2.1, Abb. 9A) und Des3 $\overline{AB}$  (Abb. 13B) dargestellt. In der Abbildung sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nur direkte Mittelwerte ohne Standardabweichungen aufgetragen. Des2B wurde aus dieser Analyse ausgenommen, da in dem Duplikat Des2 $\overline{AB}$  (Abb. 13A) zu wenige Mittelwerte gebildet werden konnten, um eine zuverlässige polynomiale Anpassung durchführen zu können.

Die Daten des mittleren Biovolumens von Des2A wurden in Abb. 14A durch eine nicht lineare Hill-Anpassung der folgenden Gleichung (12) approximiert:

$$y = 59,88655 * x^{\frac{6,80737}{8,70985^{6,80737} + x^{6,80737}}} \quad (12)$$

mit einem Bestimmtheitsmaß R<sup>2</sup> von 0,997,

während das mittlere Biovolumen von Des3 $\overline{AB}$  durch eine polynomiale Anpassung mit folgender Gleichung (13) approximiert wurde:

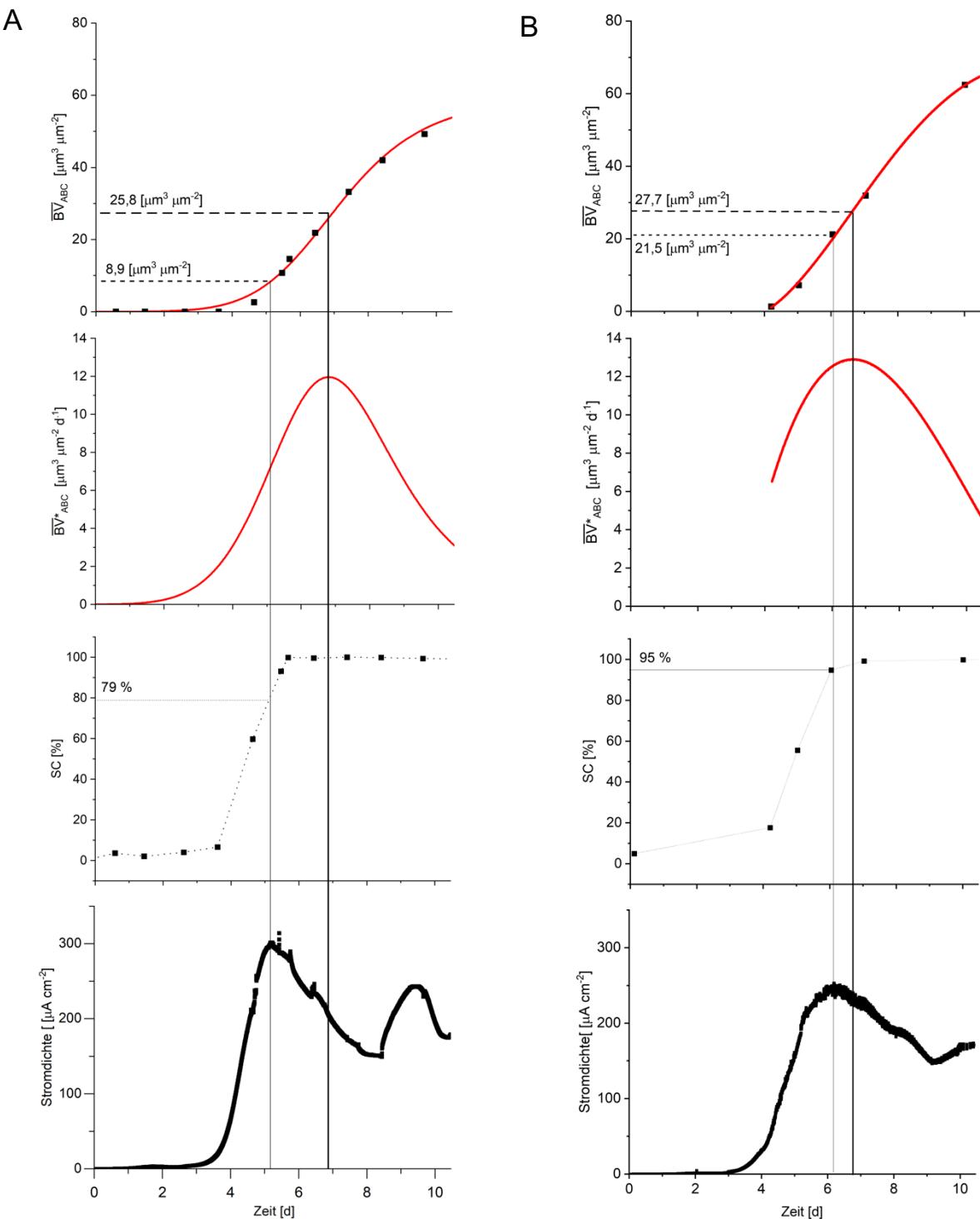
$$y = 69,10516 - 50,93886 * x + 11,51849 * x^2 - 0,8633 * x^3 + 0,0214 * x^4 \quad (13)$$

mit einem Bestimmtheitsmaß  $R^2$  von 0,999.

Zur weiteren Analyse wurde eine Ableitung der Anpassungsgleichung des mittleren Biofilmvolumens berechnet, um die Biofilmakkumulationsrate ( $\overline{BV}^*_{ABC}$ ) zu erhalten. In Tabelle 12 sind die, aus den in Abbildung 14 präsentierten Ergebnissen, ermittelten Daten dargestellt.

Der Punkt der höchsten Biofilmakkumulationsrate wurde in Des2A und Des3 $\overline{AB}$  nach  $6,8 \pm 0,1$  Tagen mit maximalen volumetrischen Wachstumsraten zwischen  $11,96 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  (Des2A) bzw.  $13 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  (Des3 $\overline{AB}$ ) und mittleren Biovolumina von ca.  $25,82 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$  (Des2A) bzw.  $27,7 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$  (Des3 $\overline{AB}$ ) berechnet. Es zeigt sich also, dass es bei der Kultivierung von *D. acetexigens* in diesen drei Versuchen ab einem Schwellenwert des mittleren Biovolumens von durchschnittlich ca.  $26,5 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$  zu einer Reduktion des Biofilmwachstums kam. Gründe für diesen Wendepunkt können eine Diffusionsbeschränkung des Substrats aus der Bulkphase in den Biofilm oder innerhalb des Biofilms (vgl. Abb. 3), eine reduzierte Substratkonzentration im Medium oder einer zunehmenden Scherkraft und damit zunehmenden Abtrag von Biomasse durch Erosion oder *sloughing* (Kap. 2.2) sein (Hackbarth *et al.*, 2020). In beiden Fällen des Inflektionspunktes ist ein Bedeckungsgrad der Anoden von 100 % festgestellt worden.

Es ist bemerkenswert, dass sich die morphologischen Parameter der Biofilme am Punkt der höchsten erreichten Stromdichte zwischen den Experimenten mit unterschiedlichen inkulierten Zelldichten stark unterscheiden. Des2A erzielt die maximale Stromdichte  $301,9 \mu\text{A cm}^{-2}$  nach ca. 5 Tagen mit einem Biofilmvolumen von  $8,89 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$ , wogegen Des3 $\overline{AB}$  erst nach 6 Tagen eine Stromdichte von  $252 \mu\text{A cm}^{-2}$  bei einem Biofilmvolumen von ca.  $21,49 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$  aufweist. Auch bei Des1 (+100 vs. SHE; Kap. 4.2.1) wurde  $\bar{J}_{max} = 241 \mu\text{A cm}^{-2}$  bei einem mittleren Biofilmvolumen von  $25,7 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2} \pm 4 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$  ca. 6,4 Tage nach Inkulation beobachtet. Da es sich hier allerdings um biologische Systeme handelt, bei denen das Wachstumsverhalten nur selten exakt zu reproduzieren ist, kann bezüglich dieses Unterschiedes des „effizientesten“ mittleren Biofilmvolumens keine klare Aussage getroffen werden. Eine tiefere Analyse und eine auf Literaturrecherche basierende Antwort auf die Frage, weshalb in einigen bioelektrochemischen Kultivierungen dieser Arbeit (Des1, Des3A, Des3B, Des4) ein Berg-Tal-Berg Gefälle mit einem wellenförmigen Verlauf der Stromdichte nachgewiesen wurde, folgt in Kap. 4.4.



**Abb. 14:** Korrelation zwischen den gemittelten Biofilmvolumina der Anodenposition A, B und C, der Biofilmmakkulationsraten, den mittleren Bedeckungsgraden des Substrats und den Stromdichten der Kultivierungen Des2A und Des3 $\overline{\text{AB}}$ . **A:** Die dargestellten Parameter beziehen sich auf die Kultivierung Des2A (Kap. 4.2.1). **B:** Die dargestellten Parameter beziehen sich auf das Duplikat: Des3 $\overline{\text{AB}}$ , wobei alle angegebene Werte aus dem Mittelwert von Des3A und Des3B gebildet wurden (Kap. 4.2.1).

**Tab. 12:** Präsentation der Biofilmparameter von Des2A und Des3~~AB~~ zum Zeitpunkt der maximalen Stromdichte sowie des Inflektionspunktes.

Versuchsreihe	Beschreibung	Zeit (d)	$\bar{J}_{max}$ ( $\mu\text{A cm}^{-2}$ )	$\overline{BV}_{ABC}$ ( $\mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$ )	$\overline{BV^*}_{ABC}$ ( $\mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2} \text{d}^{-1}$ )	SC (%)
Des2A	Maximale Stromdichte	5,2	302	8,9	7,6	79
Des3 <del>AB</del>		6,2	252	21,7	12,7	95
Des2A	Inflektionspunkt	6,9	208	25,8	12	100
Des3 <del>AB</del>		6,7	240,5	27,7	13	100

### 4.2.3 Bioelektrochemische Kultivierung und morphologische Analyse von *Geobacter sulfurreducens*

Um den in dieser Arbeit neu in mikrobiellen Fließzellen etablierten *D. acetexigens*-Stamm mit dem elektroaktiven Modellorganismus *Geobacter sulfurreducens* PCA (Kap. 2.3; 2.4.1; Kap. 3.1) zu vergleichen, werden im ersten Teil dieses Unterkapitels die chronoamperometrischen Analysen von *G. sulfurreducens* dargestellt. Hierbei wird auf die Biofilmmorphologie und der Zusammenhang dieser mit der generierten Stromdichte eingegangen.

In Abb. 15A und Abb. 15B sind zwei bioelektrochemische Kultivierungen des Organismus *G. sulfurreducens* dargestellt. Hierbei ist die Stromdichte, (schwarze Quadrate), die Konzentrationen mehrerer flüchtiger Fettsäuren (farbige Quadrate) und der Bedeckungsgrad (blaue Kreise) gegen die Zeit aufgetragen. In beiden Experimenten wurde ein Potential von 0 mV vs. SHE angelegt, 10 mM Acetat als Elektronendonator bereitgestellt und die in Kapitel 3.5.1 beschriebene Methodik gewählt. Geo1A (Abb. 15A) beschreibt die bioelektrochemische Kultivierung von *G. sulfurreducens* mit einer Inkulationszelldichte von  $OD_{600} = 0,35$ . Das in Abb. 15B dargestellte Experiment Geo1B wurde unter beinahe Identischen durchgeführt, nur wurde hier eine andere initiale  $OD_{600}$  von 0,1 gewählt um einen möglichen Unterschied der Start  $OD_{600}$  auf das Biofilmwachstum zu detektieren.

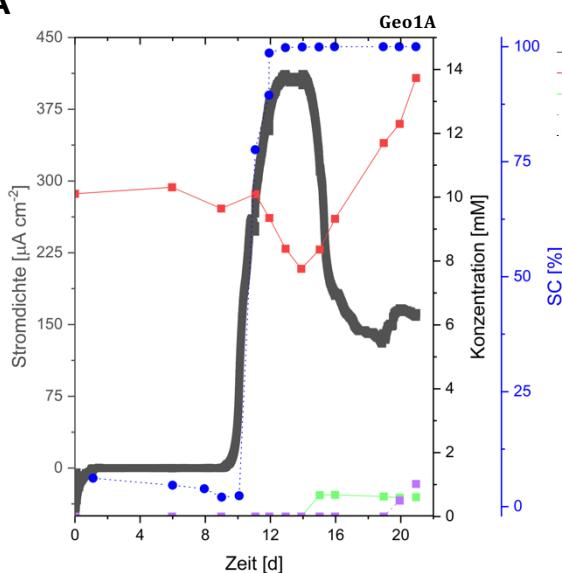
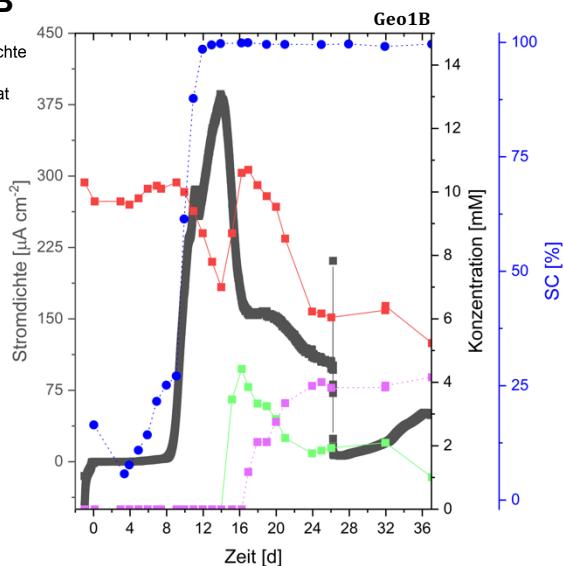
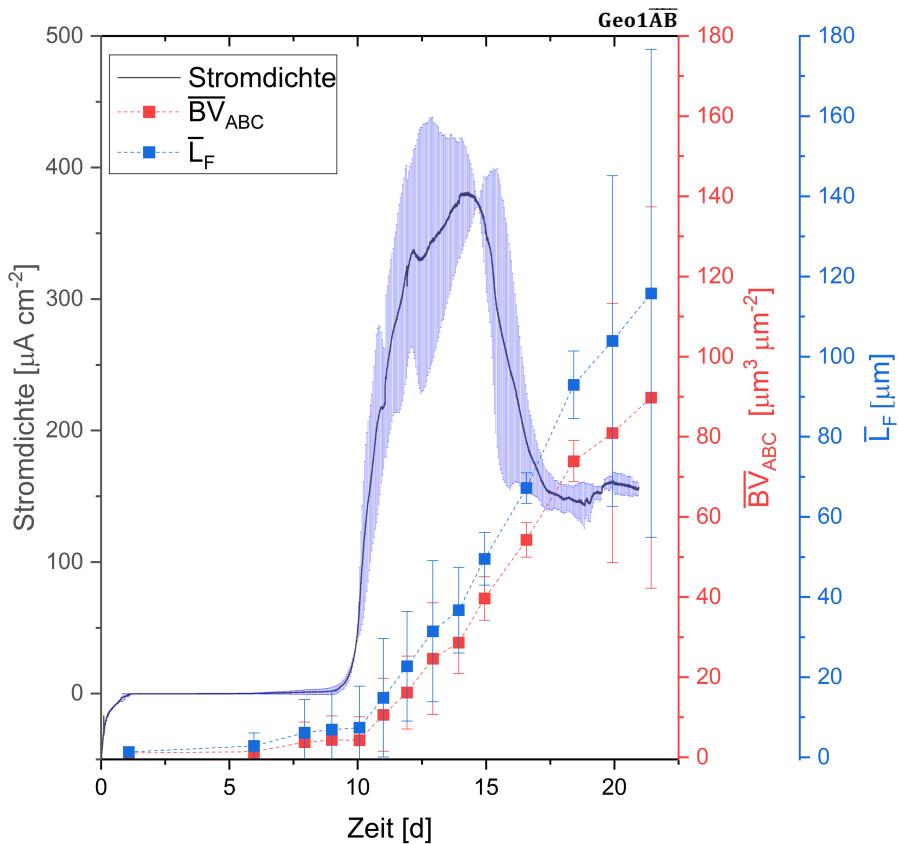
**A****B**

Abb. 15: Bioelektrochemische Analysen von *G. sulfurreducens*, bei einem Potential von 0 mV vs. SHE an der Anode.

Dargestellt ist der Verlauf der Stromdichte, des Bedeckungsgrades sowie der Konzentration mehrerer flüchtiger Fettsäuren. **A:** Zeitlicher Verlauf Tage des Experiments Geo1A über 21 Tage. **B:** Zeitlicher Verlauf des Experiments Geo1B über 37 Tage.

Ersichtlich ist, dass in beiden Kultivierungen die Zeit zwischen Inokulation und dem Anstieg der Stromdichte ca. acht Tage betrug. Da sich die inokulierten Zelldichten beider Kultivierungen (Des1A,  $OD_{600} = 0,15$ ; Des1B,  $OD_{600} = 0,35$ ) unterschieden, kann von einer zelldichteunabhängigen Adhäsionsphase von *G. sulfurreducens* in den eingesetzten Fließzellen ausgegangen werden. Auch ist erkennbar, dass der Zeitpunkt der maximalen Stromdichte in beiden Experimenten ( $412 \mu\text{A cm}^{-2}$  bei Geo1A,  $386 \mu\text{A cm}^{-2}$  bei Geo1B) mit einem Bedeckungsgrad des Substrats von 100 % einhergeht. In *D. acetexigens* konnte nachgewiesen werden, dass das Erreichen von  $\bar{J}_{max}$  auch vor Besiedelung der kompletten Substratoberfläche möglich war (Des2A, Des3AB, Abb. 9A; Abb. 10). Ähnlich wie in Des3B (Abb. 10A, Kap. 4.2.2) wurde in Geo1B an Tag 27 ein starker Einbruch der Stromdichte detektiert. Auch in diesem Experiment wurde der pH-Wert von 6,7 auf 7,3 angehoben. Allerdings geriet der pH-Wert kurzzeitig in einen sehr alkalischen Bereich mit  $pH=9,5$ , da nicht nur 0,1 M NaOH sondern 1 M NaOH zur pH-Adjustierung verwendet wurde. Somit ist für einen kurzen Zeitpunkt stark konzentrierte NaOH an dem Biofilm vorbeigeflossen und hat möglicherweise einen Großteil des Biofilmes inaktiviert. Allerdings konnte eine erneute Nutzung der Anode als  $e^-$ -Akzeptor beobachtet werden, da die Stromdichte nach dem Einbruch konstant in einen Aufwärtstrend geriet.

Um eine Korrelation zwischen der Biofilmmorphologie von *G. sulfurreducens* und der generierten mittleren Stromdichte zu untersuchen, ist in Abb. 16 der Mittelwert beider in Kapitel 4.2.3 beschriebenen Experimente (Geo1A; Geo1B) dargestellt. Hierbei wurde die mittlere Stromdichte, das gemittelte Biofilmvolumen sowie die mittlere Biofilmdicke von Geo1AB mit den entsprechenden Standardabweichungen über die Kultivierungszeit aufgetragen.



**Abb. 16:** Darstellung der mittleren gemessenen Parameter der Biofilmmorphologie und Stromdichte der bioelektrochemischen Kultivierung Geo1AB von *G. sulfurreducens* bei einem angelegten Potential von 0 mV vs. SHE. Dargestellt sind die Mittelwerte der Stromdichte, des Biofilmvolumens ( $\overline{BV}_{ABC}$ ), und der mittleren Biofilmdicke ( $\bar{L}_F$ ) über die Kultivierungszeit. Letztere richtet sich nach der Kultivierungsdauer des kürzeren Experiments (Geo1A, vgl. Abb. 15).

Im Gegensatz zu den chronoamperometrischen Analysen von *D. acetexigens* (vgl. Abb. 13, Kap. 4.2.2), kommt es bei *G. sulfurreducens* erst zu einem Absinken der Stromdichte, wenn ein Biofilmvolumen von  $39,7 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2} \pm 5,4 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$  überschritten wird. Diese Ergebnisse decken sich mit der Literatur, in der das Maximum der elektrochemischen Aktivität eines *G. sulfurreducens*-Biofilms bei Erreichen einer Biofilmdicke von 20  $\mu\text{m}$  (Sun *et al.*, 2016) bzw. 50  $\mu\text{m}$  (Reguera *et al.*, 2006) gemessen wurde. Bei dickeren Biofilmen steigt der Elektronentransportwiderstand (Renslow *et al.*, 2013) was die Elektronenabgabe zunehmend limitiert (Sun *et al.*, 2016). Manche hierdurch katabolisch reprimierten Zellen tragen nur in einem geringeren Maße zur Stromproduktion bei. Diese Zellen sorgen zusätzlich für eine sterische Hinderung des Stofftransports in tieferen Schichten des Biofilms und erschweren es den Zellen in der Nähe der Anodenoberfläche, Elektronendonoren, also Substrate aus der Bulkphase zu oxidieren.

#### **4.2.4 Vergleich des extrazellulären Elektronentransfers von *D. acetexigens* und *G. sulfurreducens*.**

Es gibt eine weitere Möglichkeit dafür, weshalb ein *Geobacter* Biofilm mit einem, bis zu  $14 - 30 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$  (vgl. Kap. 4.2.1) größeren Biofilmvolumen als *D. acetexigens* Biofilme noch immer zu erreichen der maximalen Stromdichte fähig ist. Dies kann durch den jeweils vorliegenden extrazellulären Elektronentransfer-Mechanismus erklärt werden: *G. sulfurreducens* besitzt elektronenleitfähige, pilusähnliche Proteinkomplexe, sog. *Nanowires* oder e-Pili (Lovley & Walker, 2019; Kap. 2.2). Diese sind aus stark leitfähigen Typ IVa PilA-Monomeren mit eingelagerten OmcC, OmcE, OmcS und OmcZ-Proteinen aufgebaut (Guo *et al.*, 2021). PilA dient hierbei als Rückgrad der *Nanowires*, so dass in *Geobacter*- $\Delta$ pilA-Deletionsstämmen ein starker Leitfähigkeitsverlust detektiert wurde (Holmes *et al.*, 2016). Zwar konnte die Präsenz der Cytochrome OmcE, OmcS (Katuri *et al.*, 2017) und OmcZ (Guo *et al.*, 2021), sowie die Sequenzhomologie mehrerer Typ-IV Pilus-assozierter Proteine (PilM, PilN, PilO) (Xie *et al.*, 2021) in *D. acetexigens* nachgewiesen werden, *pilA* scheint jedoch nicht im Genom vorhanden zu sein (Katuri, *et al.*, 2017; Guo, *et al.*, 2021). Diese in *D. acetexigens* nachgewiesenen *c*-Typ Cytochrome nehmen eine Schlüsselrolle im extrazellulären Elektronentransfer von *G. sulfurreducens* ein (Katuri, *et al.*, 2017, Lovly & Walker, 2019). 2009 wurde von Nevin *et al.*, berichtet, dass leitfähige Proteinkomplexe (*Nanowires*) auch nur aus den *c*-Typ-Cytochromen OmcS und OmcZ aufgebaut sein können (Filman *et al.*, 2019; Nevin *et al.*, 2009; F. Wang *et al.*, 2019). Die Länge dieser Komplexe unterscheidet sich jedoch gewaltig. Reardon und Müller beschreiben die Länge der *Nanowires* in *G. sulfurreducens* als bis zu 20  $\mu\text{m}$  reichend (Reardon & Mueller, 2013), während OmcS-OmcZ Fimbrien nur wenige Mikrometer lang sind (Guo *et al.*, 2021). Dies könnte als Erklärung dienen, weshalb *G. sulfurreducens* Biofilme bei  $\bar{J}_{max}$  ein Biofilmvolumen von ca.  $40 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$  aufweisen können, während *D. acetexigens* Biofilme ab einem Biofilmvolumen von  $10 - 25 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$  (Kap. 3.2.2) bereits eine Beeinträchtigung des Elektronentransfers erfahren.

#### **4.2.5 Analyse der Biofilmmorphologie über die laterale Ausdehnung der Anode**

Aufgrund auffälliger Unterschiede des Höhenprofilverlaufs, zwischen *D. acetexigens* und *G. sulfurreducens* Biofilmen in lateraler Richtung, wird in diesem Kapitel die Biofilmmorphologie beider Stämme über die nahezu gesamte Breite der bewachsenen Anode miteinander verglichen. Hierfür wurden die Aufnahmepositionen A, B und C gewählt (vgl. Kap. 4.3, Abb. 21), jedoch wurde die Breite der Aufnahmen von 8mm auf 15 mm (15 x 6 mm; B x L) und im darauffolgenden Experiment auf 16 mm

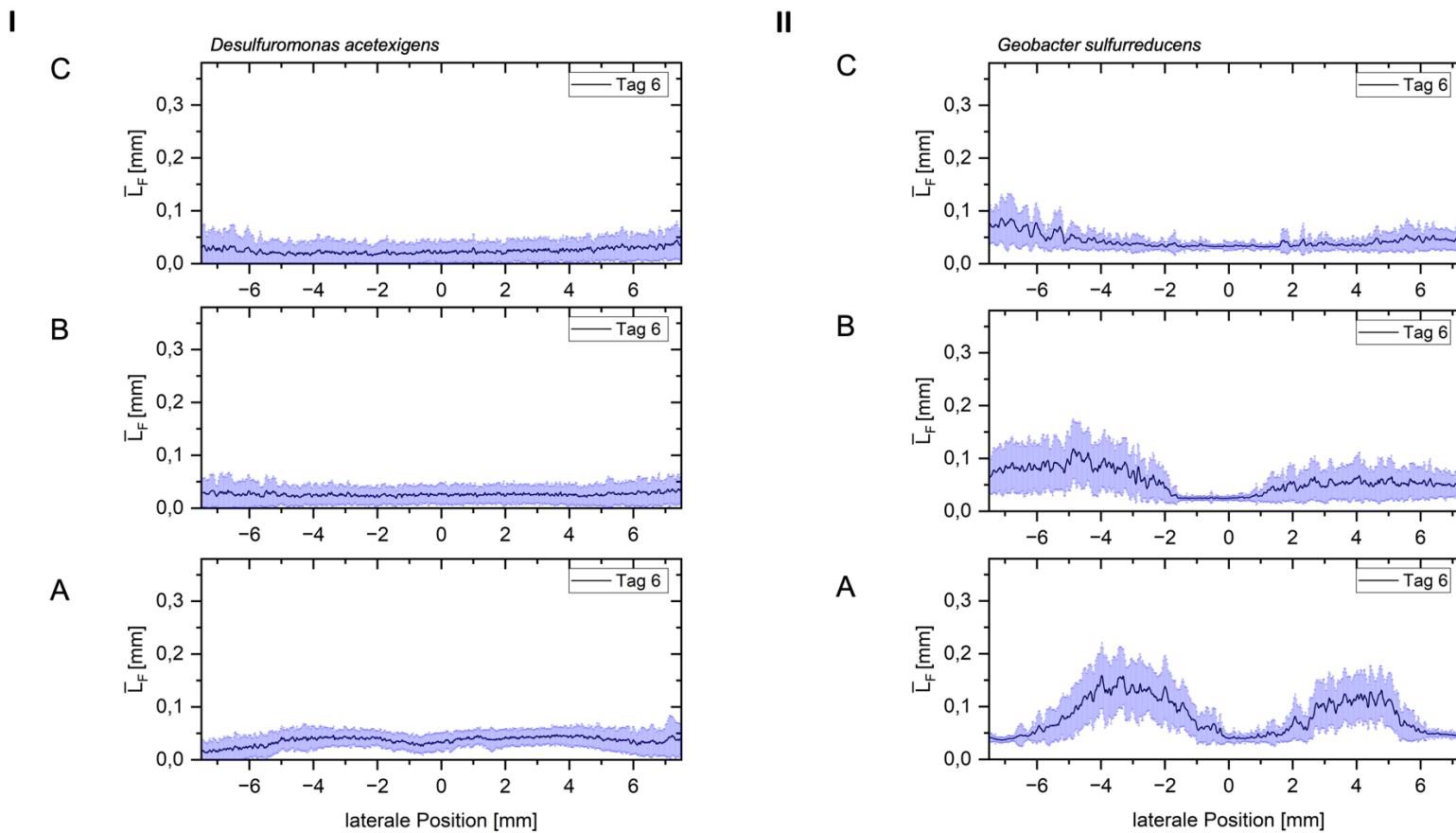
(16 mm x 6 mm; B x L) mm ausgeweitet. Somit ergab sich eine aufgenommene Fläche von insgesamt 90 mm<sup>2</sup> pro Position in Des3A und Geo1A, bzw. 96 mm<sup>2</sup> pro Position in Des3B und Geo1B.

In den Abbildungen 17 und 18 sind die mittleren lateralen Höhenverteilungen der Biofilme der Kultivierungen Des3A und Geo1A mit Standardabweichung dargestellt. Als Zentralpunkt wurde die mittige Position der Anode gewählt, die zu den seitlichen Kanten einen Abstand von je 10 mm aufweist. Die OCT-Daten wurden an Tag 6 und Tag 10 nach dem Erreichen einer Stromdichte von 0 µA cm<sup>-2</sup> und somit der Umpolung der Arbeitselektrode zur Anode (vgl. Kap. 4.2.1) generiert. Zur Verarbeitung der aufgenommenen OCT-Daten wurde nach Erstellen eines Höhenprofils eine Profildarstellung (Engl. *profileplot*) mittels des im Anhang ersichtlichen Macros „*PlotProfileWithSD*“ generiert.

Dieses Makro ist eine angepasste Version des Befehls "Plot Profile" in ImageJ, durch den die Standardabweichung jeder Y-Intensitätsspalte eines Höhenprofils berechnet und als Fehlerbalken angezeigt wird. Hierbei dient jeder B-Scan eines generierten Höhenprofils als eine tabellarische X-Reihe, welche, je nach Anzahl der hierin enthaltenen A-Scans (1875 A-Scans bei einer Aufnahmebreite von 15 mm) in Y-Spalten unterteilt wird. Da jeder B-Scan eines Höhenprofils in Y-Richtung übereinander liegt, wird also die Biofilmdicke aller A-Scans in einer Y-Spalte (750 Pixel, bei einer Aufnahmelänge von 6 mm) gemittelt, und pro Spalte die spezifische Standardabweichung berechnet.

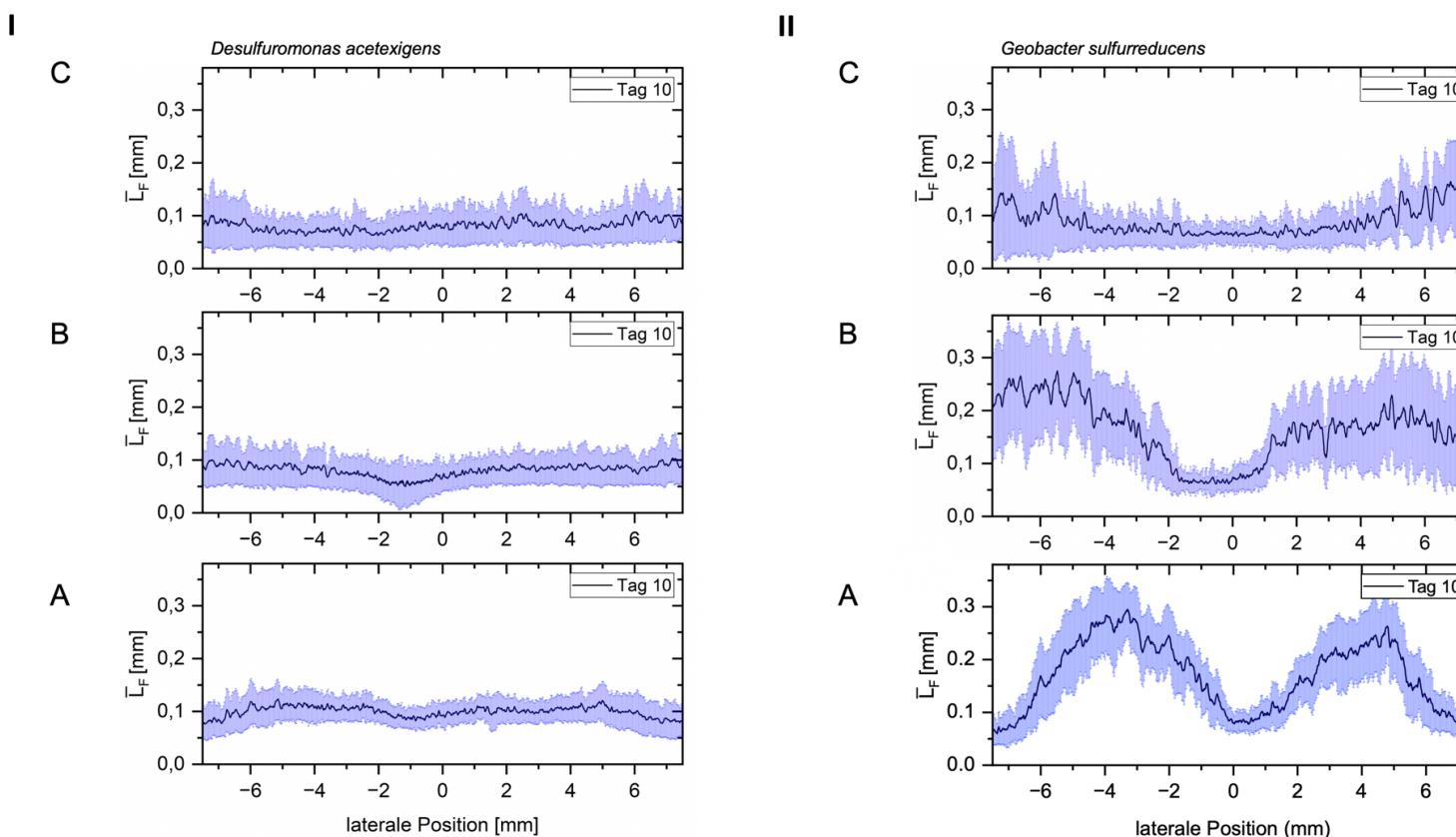
In den Abbildungsbereichen **I** sind die Profildarstellungen des Biofilms von *D. acetexigens* (Des3A), in den Bereichen **II** die Profildarstellungen des *G. sulfurreducens* Biofilms (Geo1A) dargestellt. Abb. 17 zeigt die Profildarstellungen der Biofilme an Tag 6, Abb. 18 an Tag 10 auf. Die Kennzeichnungen der jeweiligen Aufnahmeposition sind auf der linken Seite angegeben.

Es ist deutlich erkennbar, dass die mittlere Biofilmdicke des *D. acetexigens* Biofilmes (Abb. 17 und Abb. 18) eine deutlich homogener Verteilung aufweist, als bei *G. sulfurreducens* beobachtet wurde. Dieser Unterschied könnte das Resultat unterschiedlicher Reaktionen der Biofilme auf die Strömungsbedingungen (Abb. 5) in der Fließzelle sein. Bei *Geobacter* ist an Position A (nahe des Fließzelleneingangs) eine stark inhomogene Struktur erkennbar, welche drei Minima (an den seitlichen Kanten und in der Mitte der Anode) sowie zwei Maxima (links und rechts vom Mittelpunkt) aufweist. Mit zunehmender Entfernung zum Zulauf wird eine geringere Ausprägung der Maxima und somit eine leicht homogener Verteilung sichtbar. Bei *D. acetexigens* Biofilmen wird dieses wellenförmige Muster zwar in minimaler Ausprägung an Position A sichtbar, dennoch weisen diese Biofilme insgesamt eine deutlich homogener Verteilung auf. In beiden Kultivierungen konnten die höchsten Biofilme nahe dem Zulauf, mit 36,33 µm für *D. acetexigens* und 79,94 µm bei *G. sulfurreducens* 6 Tage nach Repolarisierung der Anode beobachtet werden. Auf den Gradienten der Biofilmdicke entlang der Anodenlängsrichtung wird im Kapitel 4.3 noch näher eingegangen.



**Abb. 17:** Darstellung des Höhenprofilverlaufs von *D. acetexigens* mit *G. sulfurreducens*, über die Breite der Anode, 6 Tage nach Repolarisation der Anode.

Die mittlere Biofilmdicke ( $\bar{L}_F$ ) jeder Aufnahmeposition (A, B und C) ist in schwarz dargestellt, die Standardabweichungen in blau. Als Mittelpunkt der lateralen Position wurde die Mitte der Anode gewählt, welche zu den seitlichen Kanten einen Abstand von je 10 mm aufweist. Die Ausdehnung des Bildes vom Mittelpunkt der Anode (laterale Position = 0 mm) beträgt jeweils 7,5 mm. Die auf der X-Achse dargestellten lateralen Positionen  $> 0$  geben die rechte Seite des Mittelpunktes wieder, die lateralen Positionen  $< 0$  die linke Seite. Zur Berechnung der Profildarstellung wurde das im Anhang ersichtliche Makro „PlotProfileWithSD“ genutzt. Eine genaue Beschreibung der Berechnung findet sich im oberen Absatz. **I:** Darstellung des lateralen Höhenprofilverlaufs von *D. acetexigens* (Des3A, Kap. 4.2.1). **II:** Darstellung des lateralen Höhenprofilverlaufs von *G. sulfurreducens* (Geo1A, Kap. 4.2.2).



**Abb. 18:** Darstellung des Höhenprofilverlaufs von *D. acetexigens* mit *G. sulfurreducens*, über die Breite der Anode, 10 Tage nach Repolarisation der Anode.

**I:** Darstellung des lateralen Höhenprofilverlaufs von *D. acetexigens* (Des3A, Kap. 4.2.1). **II:** Darstellung des lateralen Höhenprofilverlaufs von *G. sulfurreducens* (Geo1A, Kap. 4.2.2).

Vergleicht man die mittlere absolute Rauheit  $\bar{R}_{a, ABC}$  (M. Wagner & Horn, 2017) der aufgenommenen Lateralaufnahmen (Tab. 13), so weist die Oberflächenstruktur des *D. acetexigens* Biofilms eine Rauheit von  $\bar{R}_{a, ABC} = 21,6 \pm 1,9 \mu\text{m}$  und der *G. sulfurreducens* Biofilm eine Rauheit von  $\bar{R}_{a, ABC} = 48,9 \pm 2,2 \mu\text{m}$  auf. Allerdings muss hier mit einbezogen werden, dass die mittlere Biofilmdicke der *D. acetexigens* Biofilme im Durchschnitt um etwa  $43 \mu\text{m}$  geringer ist als bei *Geobacter* Biofilmen. Somit weist *G. sulfurreducens*, nach gleicher Zeit der aktiven Elektronabgabe eine deutlich größere mittlere Biofilmdicke ( $\bar{L}_{F_{ABC}; t6 ;t10} = 102 \mu\text{m}$ ) auf, als *D. acetexigens* ( $\bar{L}_{F_{ABC}; t6 ;t10} = 59,5 \mu\text{m}$ ). Bezieht man die mittlere Biofilmdicke in die Berechnung des Rauheitskoeffizienten  $R_a^*$  ein (vgl. Kap. 3.7.1), so ergibt sich für die *D. acetexigens* Biofilme ein  $R_a^*$  von 0,44 auf, welcher nur leicht unter dem der *Geobacter* Biofilme ( $R_a^* = 0,47$ ) liegt.

**Tab. 13:** Mittlere Biofilmdicke von *D. acetexigens* und *G. sulfurreducens* an unterschiedlichen OCT-Aufnahme positionen. Für die Berechnung der in dieser Tabelle dargestellten Parameter, wie der mittleren Biofilmdicke, der absoluten mittleren Rauheit ( $\bar{R}_a$ ) sowie des Rauheitskoeffizienten ( $\bar{R}_a^*$ ) wurden die Mittelwerte der generierten OCT-Daten an Tag 6 und Tag 10 verwendet.

Organismus	Position	$\bar{L}_{F_{ABC}; t6 ;t10}$	$\bar{R}_a$	$\bar{R}_a^*$
<i>D. acetexigens</i>	A	68 $\mu\text{m}$		
	B	54 $\mu\text{m}$	$21,6 \mu\text{m} \pm 1,9 \mu\text{m}$	$0,44 \pm 0,029$
	C	52 $\mu\text{m}$		
<i>G. sulfurreducens</i>	A	124 $\mu\text{m}$		
	B	110 $\mu\text{m}$	$48,9 \mu\text{m} \pm 2,2 \mu\text{m}$	$0,47 \pm 0,026$
	C	67 $\mu\text{m}$		

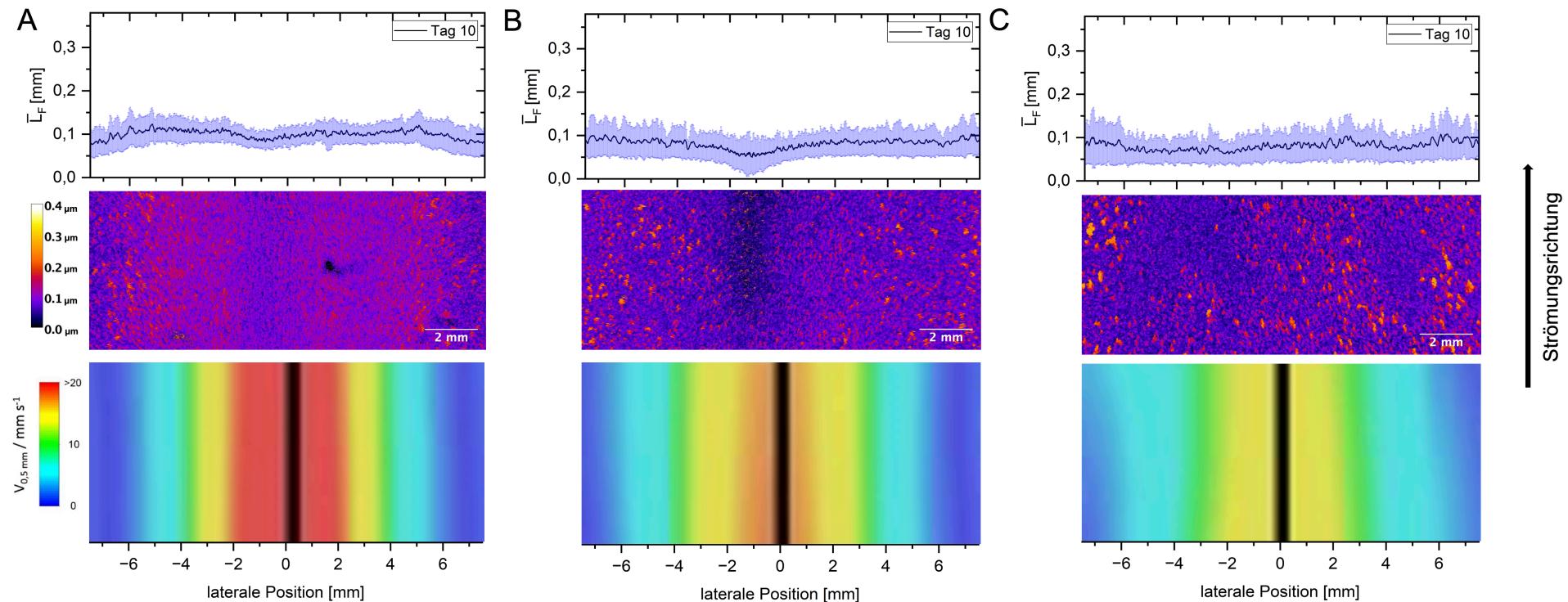
Ein Grund für diese starken lateralen Unterschiede in der Biofilmdicke zwischen *D. acetexigens* und *G. sulfurreducens* könnte auf eine unterschiedliche Anpassung der Biofilme an das Strömungsregime über der Anode zurückzuführen sein. Die beschriebenen strukturellen Unterschiede in einer Biofilmmatrix lassen sich meist auf lokale Überströmgeschwindigkeiten des Mediums zurückführen (Hackbarth *et. al.*, 2020). In dieser Publikation konnte von Hackbarth *et al.* eine Korrelation zwischen der lokalen Strömungsgeschwindigkeit und der Biofilmmorphologie durch die Kultivierung des kathodisch wachsenden Mikroorganismus *Kypridia spormanii* in den Fließzellen, die auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, gezeigt werden.

Zur Veranschaulichung wurden in Abb. 20 (*D. acetexigens*) und Abb. 21 (*G. sulfurreducens*) sowohl die Mittelwerte des Höhenprofils mit Standardabweichung, die gesamten Höhenprofile, sowie die vorherrschenden Strömungsgeschwindigkeiten dargestellt. Das Strömungsprofil wurde von Max Hackbarth zur Verfügung gestellt.

Hierbei ist ersichtlich, dass sich bei den Biofilmen beider Organismen in der Mitte des Strömungskanals (Längsachse; laterale Position = 0 mm) an den Positionen A, B und C (Kap. 3.5.1; Abb. 5) mit einer lokalen Überströmgeschwindigkeit von  $v_A = 22 \text{ mm s}^{-1}$ ;  $v_B = 16 \text{ mm s}^{-1}$  und  $v_C = 12 \text{ mm s}^{-1}$  (Hackbarth *et al.*, 2020) das jeweilige Minimum der Biofilmdicke befindet. Bei *D. acetexigens* sind, abhängig von der jeweiligen Aufnahmeposition, die jeweiligen Maxima der Biofilmdicke bei einer Strömungsgeschwindigkeit von  $\bar{v} < 10 \text{ mm s}^{-1}$  an den lateralnen Positionen von +/- 4 - 7 mm erkennbar, während *G. sulfurreducens* bei  $\bar{v} < 17 \text{ mm s}^{-1}$  dicke Biofilmstrukturen an der lokalen Position +/- 1 – 7,5 mm ausbildet. Allerdings muss erwähnt werden, dass mit dieser Analyse keine Aussage über die lokale katalytische Effizienz und somit der pro Fläche erzeugten Stromdichte, unabhängig der Biofilmdicke getätigt werden kann.

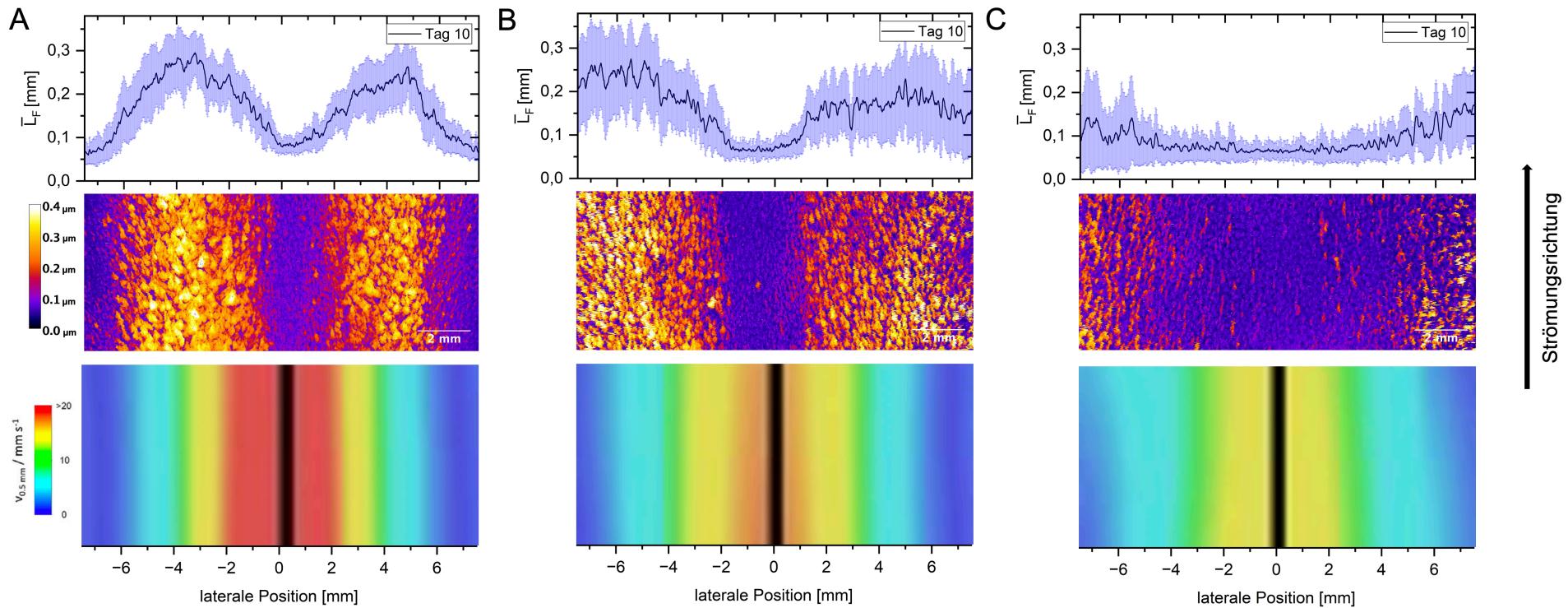
Je höher eine Strömungsgeschwindigkeit ist, desto höher ist die Versorgung des Biofilmes mit Substraten aus der Bulkphase, woraus eine erhöhte Substratumsatzrate und steigende Wachstumsrate der Zellen resultieren (Zarabadi *et al.*, 2019). Da allerdings auch die Scherbeanspruchung zunimmt und schnell wachsende Biofilme als mechanisch instabil gelten (Yan *et al.*, 2019), kann von einer erhöhten Erosion der Biofilmoberfläche und folglich von einem dichten Biofilm bei erhöhter Strömungsgeschwindigkeit ausgegangen werden (Ren *et al.*, 2021; Zarabadi *et al.*, 2019). Die Folge davon wäre zwar eine geringere Porosität, was eine limitierte lokale Substratdiffusionstiefe mit sich bringt, allerdings steigt auch der Anteil an elektroaktiven Zellen pro Raum, was wiederum zu einer erhöhten Umsatzrate bzw. erhöhter Stromdichte führen kann.

Für eine tiefere Analyse dieser Fragestellung sollte in zukünftigen Studien untersucht werden, in welchen Bereichen der Strömung welche Stromdichte erzeugt wird. Hätte man theoretisch eine in der Breite in Kompartimente geteilte Anodenfläche (z. B.: 2 mm x 100 mm; B x L), die jeweils über ein isolierendes Material voneinander getrennt wären, könnte die Stromdichte jeder einzelnen Anode auf die lokale Biofilmmorphologie bezogen werden. Auch eine in der Längsrichtung in mehrere Fragmente untergliederte Anodenfläche wäre hilfreich (z. B.: 20 mm x 20 mm; B x L). Hierbei könnte erarbeitet werden, ob der in Abb. 22 (Kap. 4.3) dargestellte Biofilm, der seine Biofilmvolumenmaxima stets nahe der Strömungskante (Kap. 3.5.2) entwickelt hat, einen höheren oder geringeren Elektronentransfer leistet als an anderer Stelle.



**Abb. 19:** Darstellung des gemittelten Höhenprofilverlaufs des *D. acetexigens* Biofilms, der Höhenprofile und der laminaren Strömungsbedingungen über die Breite der Anode.

Visualisierung der lateralen Biofilmmorphologie (Des2A, Kap. 4.2.1), 10 Tage nach Umpolung der Arbeitselektrode zur Anode an den OCT-Aufnahmepositionen A, B und C. Ersichtlich sind die lateralen Profile der mittleren Biofilmdicke ( $\bar{L}_F$ ) (oben), die lateralen Höhenprofile (mittig) und die errechneten Strömungsprofile 500  $\mu\text{m}$  oberhalb der Anodenoberfläche, ausgehend von der lateralen Position auf der Anode (Hackbart *et al.*, 2020). Die Farbskalierung (mittig links) des Höhenprofils reicht von 0 – 400  $\mu\text{m}$ ; die Strömung erreicht bei einem Volumenstrom durch die Fließzelle von 100  $\text{mL min}^{-1}$  eine maximale Geschwindigkeit von 23  $\text{mm s}^{-1}$  an Position A, nahe des Zulaufs in der Mitte des Fließkanals. Die Geschwindigkeitsskalierung ist unten links dargestellt, die Strömungsrichtung ist rechts gekennzeichnet.



**Abb. 20:** Darstellung des gemittelten Höhenprofilverlaufs des *G. sulfurreducens* Biofilms, der Höhenprofile und der laminaren Strömungsbedingungen über die Breite der Anode.

Visualisierung des lateralen Biofilmmorphologie (Geo1A, Kap. 4.2.3; Kap. 4.2.4), 10 Tage nach Umpolung der Arbeitselektrode zur Anode an den OCT-Aufnahmepunkten A, B und C.

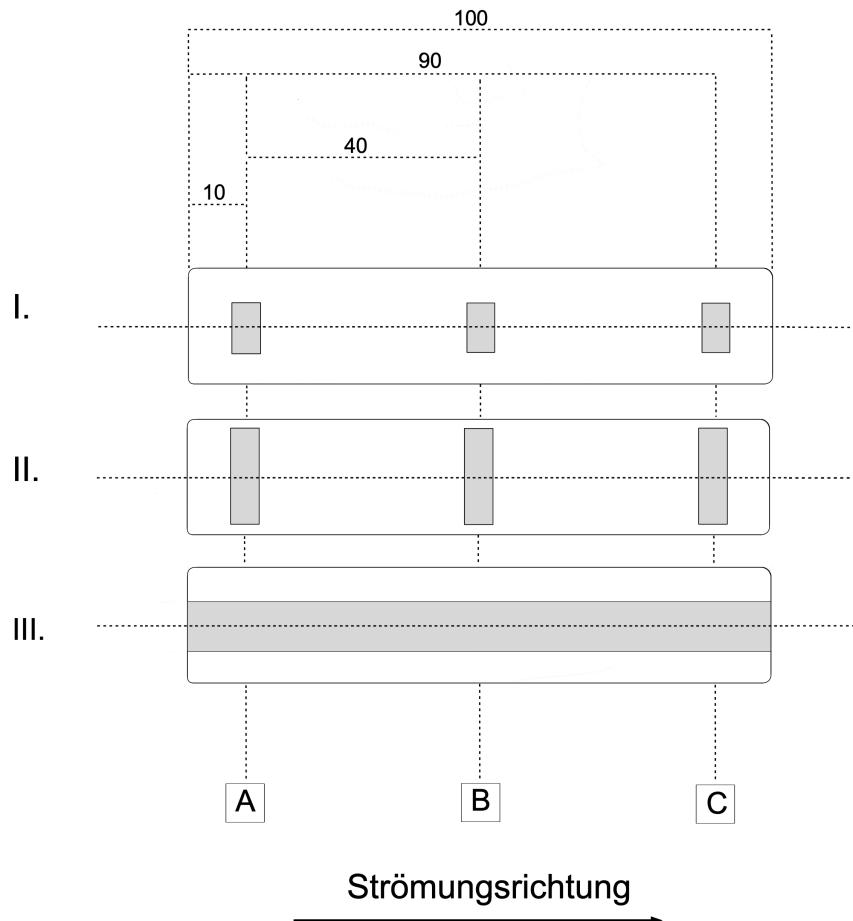
Für eine genaue Beschreibung dieser Abbildung kann die Bildunterschrift von Abb. 20 herangezogen werden.

Um diese Analyse als Duplikat darzustellen, wurden ebenfalls die lateralen Biofilmmorphologien der *Desulfuromonas*-, und *Geobacter*-Biofilme (Des3B, Geo1B) analysiert. Hier wurde eine Fläche von 96 mm<sup>2</sup> pro Aufnahmeposition visualisiert (16 mm x 6 mm, B x L). Die entsprechenden Grafiken sind im Anhang dargestellt (Abb. S5 – S8). Um sicherzustellen, dass in beiden Experimenten die gleichen Strömungsbedingungen vorgeherrscht haben, wurde nach Beenden dieser Experimente die Pumpleistung der beiden verwendeten Magnetzahnradpumpen (Kap. 3.5.1, Abb. 4) bestimmt. Hierbei wurde nachgewiesen, dass der tatsächliche Volumenstrom nicht, wie vor allen Duplikat-Kultivierungen (vgl. Tab. 11) bestimmt, bei 100 ml min<sup>-1</sup> und somit einer mittleren Strömungsgeschwindigkeit im Fließzellenkanal von  $\bar{v} = 1,5 \text{ cm s}^{-1}$  lag, sondern in Des3A 110 mL min<sup>-1</sup> ( $\bar{v} = 1,65 \text{ cm s}^{-1}$ ) und in Geo1B 114 ml min<sup>-1</sup> ( $\bar{v} = 1,7 \text{ cm s}^{-1}$ ) aufwies. Trotz der leicht erhöhten Strömungsgeschwindigkeit konnten auch in diesen Analysen die zuvor diskutierten Zusammenhänge zwischen Biofilmmorphologie und Strömungsgeschwindigkeit beobachtet werden. Dies bestätigt die Reproduzierbarkeit dieser Muster in der verwendeten Fließzelle.

## 4.3. OCT-Visualisierungsroutinen der Biofilmmorphologie auf der Anode

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Biofilmausschnitte zur Generierung von OCT-Datensätzen visualisiert, um die gesamte Biofilmmorphologie auf der Anode (20 mm x 100 mm, B x L) möglichst genau wiederzugeben. Eine schematische Darstellung der Anode mit den drei OCT-Positionen A, B und C sowie der visualisierten Fläche (in Grau dargestellt) ist in Abbildung 21 zu erkennen. Punkt **I** bezieht sich auf die in Kapitel 3.7 beschriebene Methodik zur OCT-Datengenerierung, mit der alle in Kapitel 4.2.1 – 4.2.3 berechneten, dargestellten und diskutierten Parameter aufgenommen wurden. Hierbei ist eine 48 mm<sup>2</sup> große Fläche (8 mm x 6 mm; B x L) an den drei dargestellten Positionen: A, B und C genutzt worden. Die im Kapitel 4.3 beschriebene laterale Biofilmmorphologie wurde ebenfalls an diesen drei Punkten mit einer visualisierten Fläche von 90-96 mm<sup>2</sup> (15 x 6 mm; 16 x 6 mm; B x L; nachzulesen in Kapitel 4.3) analysiert (**II**). Die unterste visualisierte Fläche (**III**) wird, im folgenden Abschnitt beschrieben und diskutiert:

2020 wurde von Hackbarth *et. al.* dargestellt, dass der Mittelwert von OCT-Datensätzen, welche genau an den drei Positionen A, B und C zur Bestimmung der Biofilmmorphologie generiert wurden, repräsentativ für die Biofilmmorphologie auf der gesamten Arbeitselektrode ist. Zwar wurde hier der mittlere Strömungskanal durch Aufnahmeflächen mit einer Breite von jeweils 6 mm (ausgehend von der mittleren Spiegelachse der Arbeitselektrode, vgl. Abb. 21) visualisiert, dennoch konnte die Biofilmmorphologie der gesamten Arbeitselektrode ausreichend genau wiedergespiegelt werden (Hackbarth *et. al.*, 2020).



**Abb. 21:** Bemaßung der in diesem Projekt visualisierten Flächen auf der Anode in mm. Die visualisierten Flächen sind als graue-, die Anode als weiße Flächen dargestellt. Der jeweilige Mittelpunkt liegt auf der vertikalen Spiegelachse der Anode (gestrichelte Linie). Die Strömungsrichtung ist unterhalb der schematischen Darstellung abgebildet. **I:** Jede Fläche (A, B und C) besitzt eine Abmessung von  $8 \times 6 \text{ mm}^2$  ( $B \times L$ ). **II:** Jede Fläche (A, B und C) besitzt eine Abmessung von  $15 \times 6 \text{ mm}^2$  ( $B \times L$ ). **III:** Die visualisierte Fläche hat eine Abmessung von  $8 \times 100 \text{ mm}^2$  ( $B \times L$ ).

Allerdings wurde in dieser Publikation die Arbeitselektrode in der Fließzelle als Kathode für die Kultivierung von *Kyridia spormanii* bei 60 °C und 5 Bar genutzt. Damit unterscheiden sich die Kultivierungsbedingungen stark von denen der anodisch wachsenden Biofilme von *D. acetexigens* oder *G. sulfurreducens*. Da mit den, in der vorliegenden Arbeit bisher beschriebenen, Visualisierungsroutinen nur ca. 7 – 14 % der kompletten Anodenoberfläche observiert wurden, soll in diesem Kapitel geprüft werden, ob dies auch für die in dieser Arbeit untersuchten Biofilme ausreichend repräsentativ ist.

Dafür wurden an den Tagen 6, 8 und 11 des Experiments Des2A (Kap. 4.2.2) OCT-Datensätze über die komplette Anodenlänge generiert (100 mm x 8 mm; L x B), womit etwa 40 % des Biofilms auf der gesamten Anode visualisiert wurden (vgl. Abb. 21 III). Hierfür wurden insgesamt 11 OCT-Datensätze (8 mm x 10 mm; B x L) erstellt und anschließend zusammengefügt. Die zugehörigen Höhenprofile sind in Abb. 22 dargestellt, die Farbcodierung reicht bis zu einer maximalen Biofilmdicke von 150 µm. Im Übrigen wurden die jeweiligen Biofilmvolumina aller einzelnen OCT-Datensätze berechnet und unter den Höhenprofilen grafisch dargestellt.

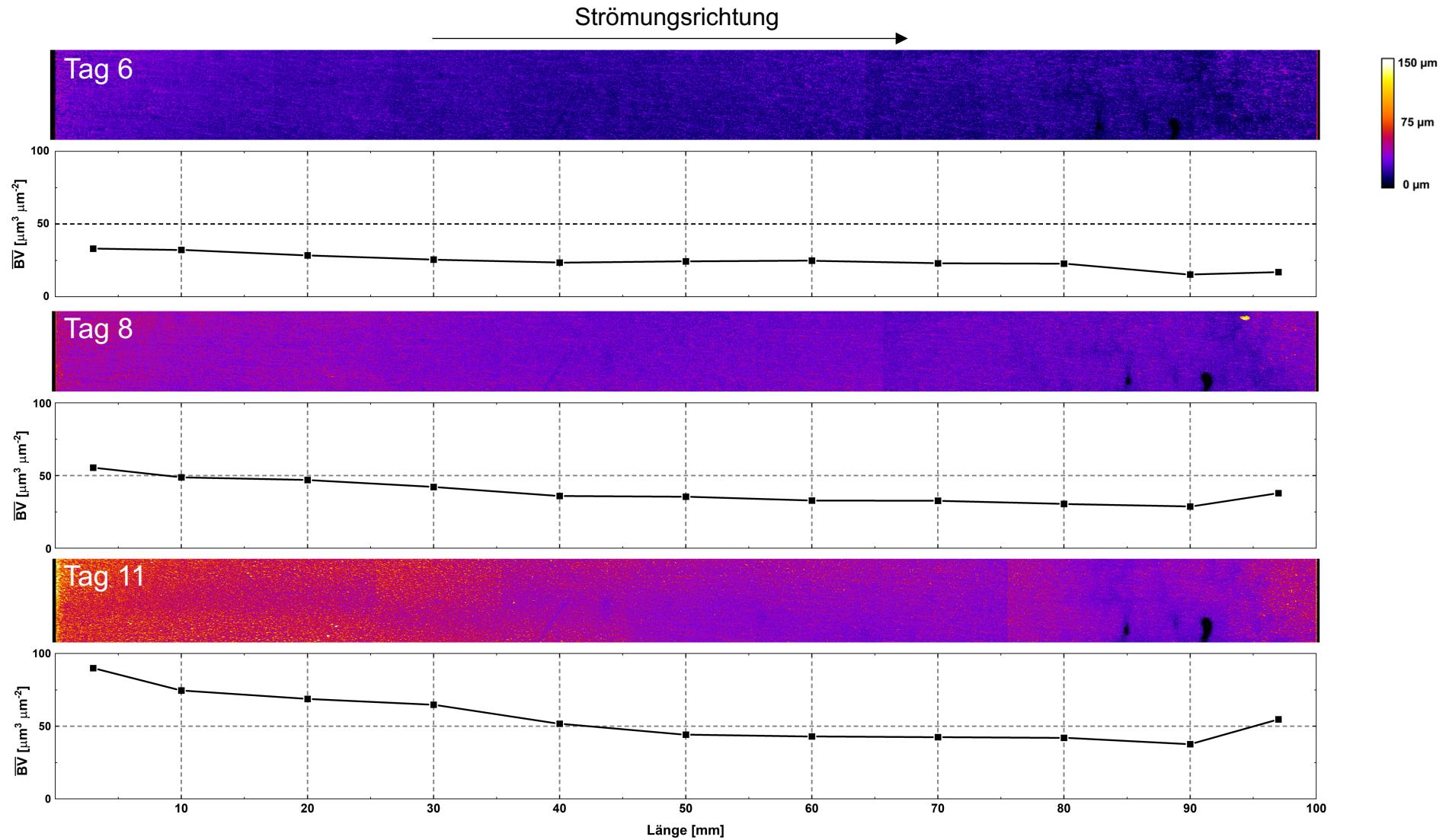
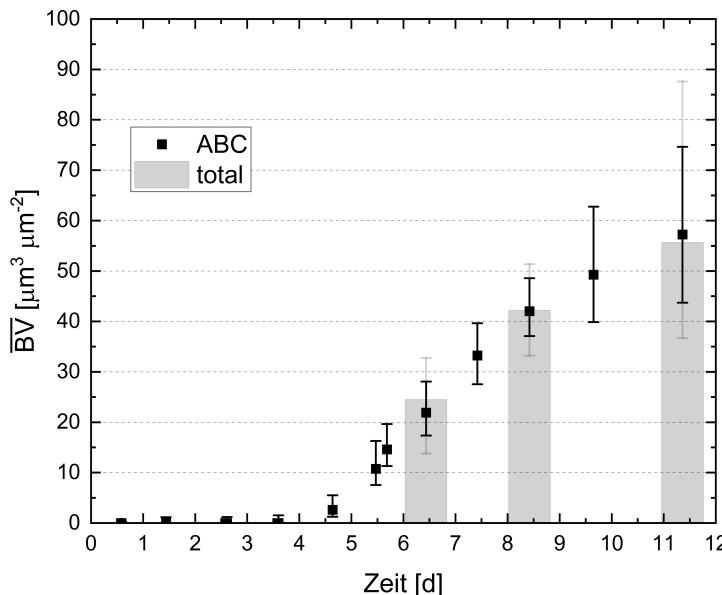


Abb. 22: Aus jeweils 11 OCT-Datensätzen zusammengefügte Höhenprofile über die gesamte Länge der Anode an den Tagen 6, 8 und 11 der Kultivierung Des2A von *D. acetexigens*. Zusätzlich sind die berechneten Biofilmvolumina dargestellt. Für eine Einschätzung der in dieser Arbeit visualisierten Flächen ist Abbildung 21 heranzuziehen.

Um zu belegen, dass die drei Visualisierungspunkte A, B und C (Abb. 21 I, Kap. 3.5.1) ausreichend sind, um quantitative, repräsentative Aussagen über den Biofilm über die gesamte Anodenlänger treffen zu können, wurde  $\overline{BV}_{ABC}$  mit dem gemittelten Biovolumen  $\overline{BV}_{total}$  der gesamten Länge (100 mm) verglichen. Dieser Vergleich ist in Abbildung 23 ersichtlich.

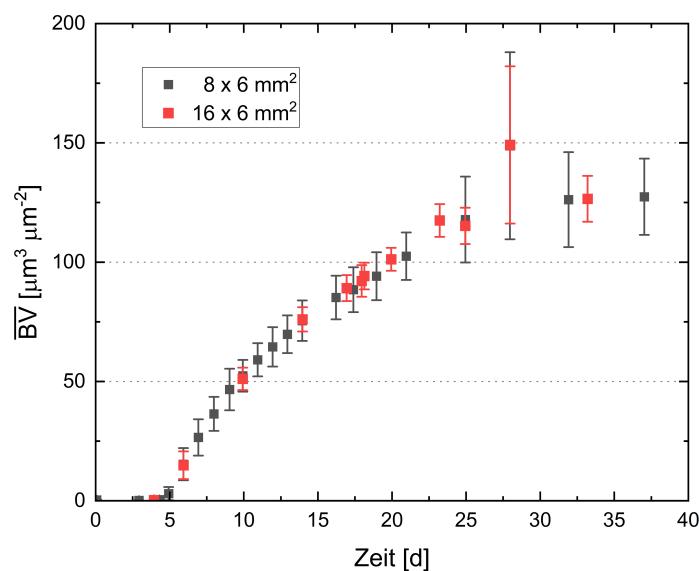


**Abb. 23:** Vergleich des gemittelten Biofilmvolumens der Positionen A, B und C (schwarz) sowie des mittleren Biofilmvolumens der gesamten Länge der Anode (grau). Die Fehlerbalken geben die jeweils gemessenen minimalen-, und maximalen Biovolumina an.

Die gemittelten Biofilmvolumina der drei Positionen sind als schwarze Rechtecke, das gemittelte Biofilmvolumen der kompletten Länge als graue Balken dargestellt. Die jeweils gemessenen minimalen und maximalen Biovolumina sind in Form der Fehlerbalken mit aufgetragen. Der Vergleich der beiden gemittelten Biovolumina zeigt, dass die von Hackbarth *et al.* entwickelte und zeitsparende Visualisierung der festgelegten Flächen A, B und C auch bei der anodischen Operation der mikrobiellen Fließzelle mit zwei weiteren bakteriellen Stämmen ausreichend genau ist. Zwar können zwischen dem gemittelten  $\overline{BV}_{total}$  von ca.  $24,51 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$  an Tag 6 zu dem Mittelwert aus A, B und C ( $\overline{BV}_{ABC} = 21,9 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$ ) ein Unterschied von 10,64 % errechnet werden, betont werden sollte hier, dass in der OCT-Datensätzen über die komplette Länge auch die ersten bzw. letzten 10 mm der Anode aufgenommen wurden. Hierbei handelt es sich um Stellen, welche in Strömungsrichtung kurz hinter bzw. vor einer Strömungskante liegen (vgl. Kap. 3.5.1), da die Anode ca. 20  $\mu\text{m}$  in den Fließzellenkanal hineinragt. Dies sorgt für eine starke Verwirbelung des Mediums, die vermutlich eine bessere Substratversorgung und geringere Diffusionslimitierung des hier wachsenden Biofilms bewirkt. Folglich begünstigen diese Strömungskanten das Biofilmwachstum, was in Abbildung 22 ersichtlich ist. Zu allen für die Visualisierung der Biofilmmorphologie genutzten Tagen ist an Position 1 (Länge = 5 mm) immer das höchste Biovolumen auf der kompletten Anode nachzuweisen, während das geringste meistens an der Position 10 (Länge = 90 mm) beobachtet werden kann (vgl. Abb. 22). Doch auch die Abweichung von

ca. 10 % ist angesichts einer Visualisierung realer, biologischer Systeme aufgrund natürlicher Schwankungen sehr gering. An Tag 8 und Tag 12 beträgt die Abweichung nur 0,4 – 2,5 %, was die Aussagekraft der bisher verwendeten Visualisierungsroutine noch einmal unterstreicht.

Um ebenfalls eine Einschätzung zu erlangen, ob die Breite der Aufnahmepositionen A, B und C von 8 mm ausreichend ist, kann aus der in Kapitel 4.2.5 dargestellten Analyse der lateralen Biofilmmorphologie eine vergleichende Aussage getroffen werden. In Abbildung 24 sind sowohl die gemittelten Biofilmvolumina der Stellen A, B und C als auch die an denselben Positionen, aber mit der doppelten Bildbreite von 16 mm bestimmten Biofilmvolumina über die Kultivierungszeit aufgetragen. Als Beispiel wurde das Experiment Des3B gewählt, da dieses Experiment über eine sehr lange Kultivierungszeit von 38 Tagen betrieben wurde.

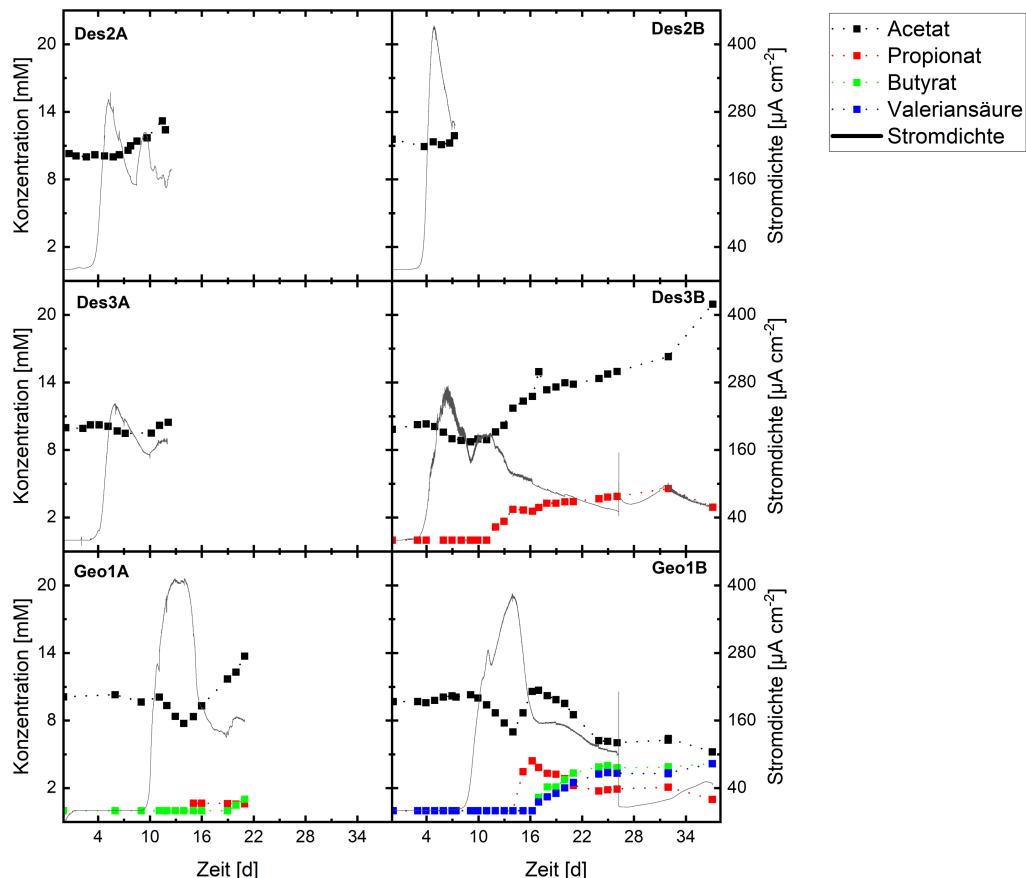


**Abb. 24: Vergleich des mittleren Biovolumens von *D. acetexigens* der Positionen A, B und C mit einer Aufnahmebreite von 8 mm (grau) sowie des mittleren Biovolumens mit einer Aufnahmebreite von 16 mm (rot). Die dargestellten Ergebnisse beziehen sich auf das Experiment Des3B (Kap. 4.2.2).**

Das gemittelte Biovolumen der drei Positionen mit einer Skalierung von 8mm x 6mm; B x L ( $48 \text{ mm}^2$ ) ist als schwarze Rechtecke, das gemittelte Biovolumen der 16 mm x 6 mm; B x L skalierten Flächen ( $96 \text{ mm}^2$ ) als rote Rechtecke dargestellt. Die Standardabweichungen sind durch die dargestellten Fehlerbalken gekennzeichnet. Betrachtet man die Abweichung zwischen den Biofilmvolumina der unterschiedlichen Aufnahmeflächen, so ergibt sich eine mittlere Abweichung von unter einem Prozent (0,92 %). Die in diesem Kapitel beschriebenen geringen Abweichungen von Längs- und Breitbildaufnahmen (vgl. Abb. 23, Abb. 24) zu den OCT-Daten welche an den Punkten A, B und C mit einer Skalierung von 8 mm x 6 mm; B x L (vgl. Abb. 21 I) generiert wurden, zeigen, dass diese Visualisierungsroutine repräsentativ ist, um den gesamten Biofilm auf der Anode (20 mm x 100 mm; B x L) zu charakterisieren. Somit können alle bisher in dieser Arbeit dargestellten Berechnungen und Abbildungen, welche sich auf OCT-Daten beziehen, als sehr zufriedenstellend aussagekräftig beurteilt werden.

## 4.4 Analyse der Acetatproduktion und phylogenetische Klassifizierung der mikrobiellen Konsortien

Ein Ziel dieser Arbeit ist es nachzuweisen, dass der Betrieb von mikrobiellen Elektrolysezellen mit *D. acetexigens* als Katalysator eine höhere Wasserstoffausbeute ermöglicht als mit *G. sulfurreducens*. Eine Möglichkeit des direkten Vergleichs stellt die Berechnung der *CE* (Kap. 3.5.1; Kap. 4.2.1) dar. Allerdings konnte bei allen bisher dargestellten Kultivierungen nur in Des1 eine valide *CE* berechnet werden, da die Acetatkonzentration über den Zeitraum des Experimentes um 2,23 mM abnahm (Kap. 4.2.1). Da Acetat in diesem Versuch die einzige genutzte Elektronen- und Kohlenstoffquelle darstellt, konnte eine *CE* von 95 % berechnet werden. Wie schon in Kapitel 4.2.1 erläutert, kann damit die Nutzung des kathodisch produzierten Wasserstoffs als Elektronendonator ausgeschlossen werden (Katuri et al., 2020). In allen weiteren *Desulfuromonas*-, sowie *Geobacter*-Kultivierungen wurde jedoch eine Zunahme der Acetatkonzentration beobachtet (Kap. 4.2.2; Kap. 4.2.4). In Abbildung 25 sind die gemessenen Säurenkonzentrationen aller Duplikat-Kultivierungen von *D. acetexigens* (Des2AB, Des3AB) und *Geobacter sulfurreducens* (Geo1AB), über die Kultivierungszeit dargestellt. Die jeweilige erreichte Stromdichte wird ebenfalls gezeigt.



**Abb. 25:** Darstellung der VFA-Konzentrationen aller Duplikat-Kultivierungen.

Eine detaillierte Beschreibung aller dargestellten bioelektrochemischen Kultivierungen ist in Kapitel 4.2 zu finden.

Wird aus den mittleren Stromdichten der in Abb. 25 dargestellten Experimente die Menge an abgegebenen Elektronen berechnet und diese auf die Menge von  $e^- = 8$  Elektronen bezogen, welche bei der vollständigen Oxidation von einem Molekül Acetat zu  $\text{CO}_2$  frei werden, kann eine hypothetisch oxidierte Substratmenge (Acetatumssatz) berechnet werden. In dieser Rechnung wird davon ausgegangen, dass Acetat das einzige, für einen Elektronentransfer auf die Anode genutzte Substrat ist und alle Elektronen mit einer  $CE$  von 100% an die Anode abgegeben werden. Die Gesamtmenge an transferierten Elektronen wird aus der Stromdichte errechnet. Der berücksichtigte Zeitraum beginnt mit dem Erreichen einer positiven Stromdichte (Umpolung der Arbeitselektrode zur Anode, vgl. Kap. 4.2.1) und endet mit dem Ende der jeweiligen Kultivierung. Wird die anhand der Stromstärke berechnete netto verbrauchte Acetatkonzentration ( $\Delta C_{\text{Ac}, \text{Umsatz}}$ ) von der Acetatkonzentration zu Beginn jeder Kultivierung  $C_{\text{Ac}, t_0}$  subtrahiert (14) kann die final zu erwartende Acetatkonzentration ( $C_{\text{Ac}, \text{erwartet}, t_E}$ ) berechnet werden:

$$C_{\text{Ac}, \text{erwartet}, t_E} = C_{\text{Ac}, t_0} - \Delta C_{\text{Ac}, \text{Umsatz}} \quad (14)$$

Die Differenz zwischen  $C_{\text{Ac}, \text{erwartet}, t_E}$  und der tatsächlich final gemessenen Konzentration der flüchtigen Fettsäuren (*voltily fatty acids*, VFA) ( $C_{\text{VFA}, t_E}$ ) kann demnach auf im System aufgebaute Fettsäuren ( $C_{\text{VFA}, \text{prod}}$ ) zurückgeführt werden (15).

$$C_{\text{VFA}, \text{prod}} = C_{\text{VFA}, t_E} - C_{\text{Ac}, \text{erw}} \quad (15)$$

In Tabelle 14 sind die genutzten Zielorganismen (Spalte 1) der bioelektrochemischen Kultivierungen (Spalte 2), die für obige Berechnung berücksichtigte Zeit (siehe oben; Spalte 3) sowie der Mittelwert der jeweiligen Stromdichte aufgetragen (Spalte 4). Die mittels der IC (Kap. 3.6.1) erfassten Substratkonzentrationen zum Startzeitpunkt ( $C_{\text{Sub}, t_0}$ ) sind in Spalte 5 angegeben, während die netto verbrauchten Acetatkonzentrationen ( $\Delta C_{\text{Ac}, \text{Umsatz}}$ ) in Spalte 6 dargestellt werden. Die somit final zu erwartende Acetatkonzentration ( $C_{\text{Ac}, \text{erwartet}, t_E}$ ) und die tatsächlich final gemessene Konzentration der Fettsäuren ( $C_{\text{VFA}, t_E}$ ) jeder Kultivierung sind in Spalte 7 und 8 aufgetragen. Die ermittelten Konzentrationen der im System aufgebauten Fettsäuren ( $C_{\text{VFA}, \text{prod}}$ ) sind in Spalte 9 ersichtlich.

Zur Generierung der jeweiligen mittleren Stromdichte  $\bar{J}$  ( $\mu\text{A cm}^{-2}$ ) hätten im Duplikat Des2AB bis zu 2,5 mM Acetat, sowie in Des3AB und Geo1AB bis zu 8 mM Acetat zu  $\text{CO}_2$  oxidiert werden müssen (Tab. 14, Spalte 7). Je nach Kultivierungen konnte allerdings eine Acetatproduktion zwischen 2,8 mM Acetat und bis zu 19,2 mM Acetat nachgewiesen werden.

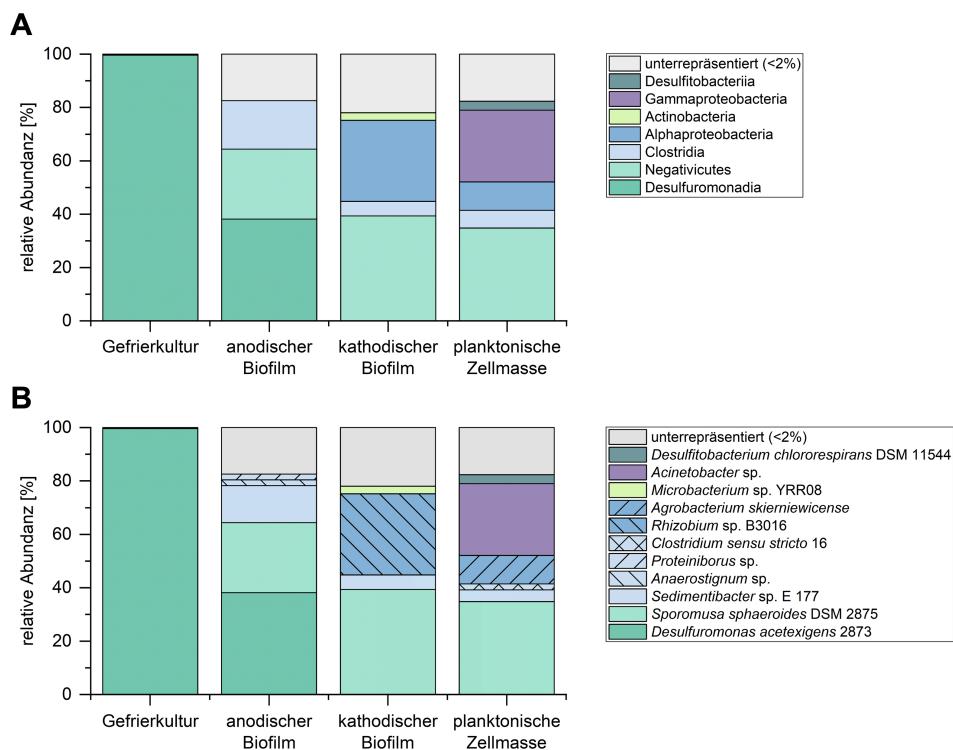
**Tab. 14:** Darstellung der mittels IC nachgewiesenen Substrat-, und Fettsäurekonzentrationen  $C_{Sub,t0}$ ,  $C_{VFA,tE}$ , der theoretisch umgesetzten Acetatkonzentrationen  $\Delta C_{Ac,Umsatz}$ , der verbrauchten netto Acetatkonzentrationen zum Ende der Kultivierungen ( $C_{Ac,erwartet,tE}$ ) und der jeweils produzierten flüchtigen Fettsäuren ( $C_{VFA,prod}$ ) (Ac.: Acetat, Prop.: Propionat, But.: Butyrat, Val.: Valeriansäure) der Duplikat Kultivierungen Des2AB, Des3AB und Geo1AB. Eine Erläuterung aller dargestellter Parameter ist auf Seite 62 zu finden.

Zielorganismus	Kultivierung	Zeit (Tage)	$\bar{J}(\mu\text{A cm}^{-2})$	$C_{Sub,t0}$	$\Delta C_{Ac,Umsatz}$	$C_{Ac,erwartet,tE}$	$C_{VFA,tE}$	$C_{VFA,prod}$
<i>D. acetexigens</i>	Des2A	6	137,7	10,3 mM Ac.	- 1,9 mM Ac.	8,4 mM Ac.	12,4 mM Ac.	4 mM Ac.
	Des2B	6,7	170,1	11,6 mM Ac.	- 2,5 mM Ac.	9,1 mM Ac.	11,9 mM Ac.	2,8 mM Ac.
	Des3A	12,1	115,7	10 mM Ac.	- 3,1 mM Ac.	6,9 mM Ac.	10,5 mM Ac.	3,7 mM Ac.
	Des3B	36,5	98,1	9,8 mM Ac.	- 8 mM Ac.	1,8 mM Ac.	21 mM Ac. 2,9 mM Prop.	19,2 mM Ac. 2,9 mM Prop.
<i>G. sulfurreducens</i>	Geo1A	12	226,4	10,1 mM Ac.	- 6,1 mM Ac.	4 mM Ac.	13,7 mM Ac.	9,7 mM Ac.
							0,6 mM Prop.	0,6 mM Prop.
	Geo1B	33,9	105,1	10,3 mM Ac.	- 8 mM Ac.	2,3 mM Ac.	1 mM But. 4,2 mM But.	1 mM But. 4,2 mM But.
							4,2 mM Val.	4,2 mM Val.

Ebenfalls unterscheidet sich die Kohlenstoffbilanz der Substratmenge im Reaktor zwischen Start und Ende jeder Kultivierung. In Des3B, Geo1A und Geo1B wurden mehrere, zu Beginn nicht zugegebene VFAs, wie Propionat, Butyrat oder Valeriansäure nachgewiesen. In der Literatur wurde bisher keine Propionatsynthese von *D. acetexigens* in BES beschrieben. Für *G. sulfurreducens* wurde zwar bei einem Überflussmetabolismus eine Formiat-Assimilation erwähnt (Aklujkar *et al.*, 2009), eine Produktion von Propionat, Butyrat oder Valeriansäure konnte jedoch noch nicht erfasst werden. Betrachtet man alle oben dargestellten Ergebnisse, so muss es mehrere Gründe für die über die Zeit der Kultivierungen andauernde VFA-Produktion geben.

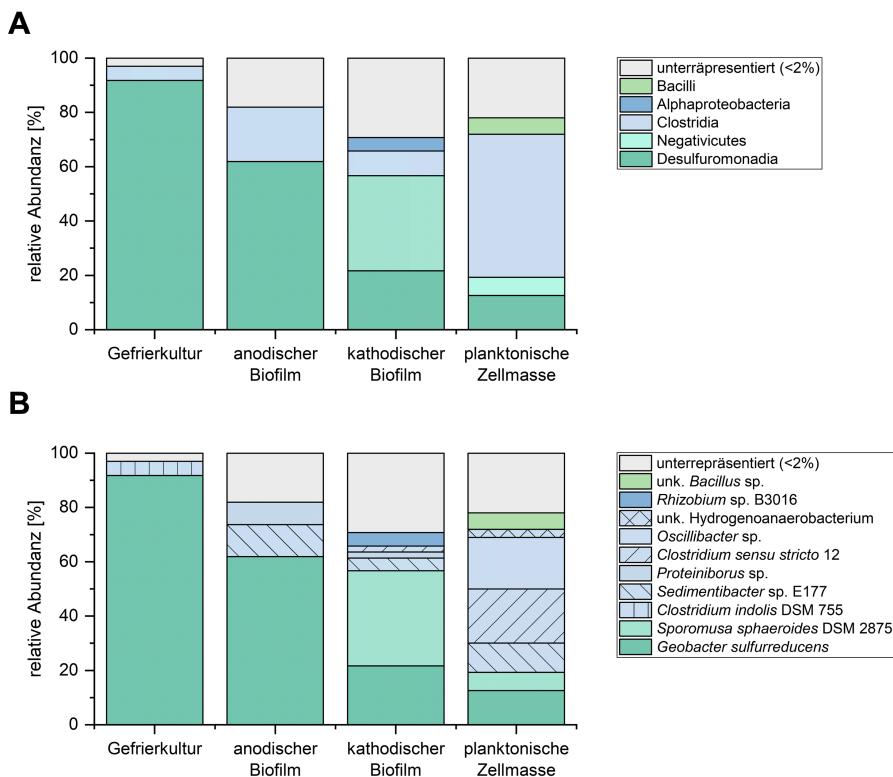
Eine Möglichkeit der Acetatproduktion in BES, würde die Präsenz von acetogenen Bakterien darstellen (Aryal *et al.*, 2017). Mehrere acetogene Bakterien wie *Sporomusa ovata*, *Sporomusa sphaerooides* *Acetobacterium woodii* oder *Clostridium aceticum*, die dem taxonomischen Phylum der *Firmicutes* zugehören, wurden bereits monokulturell zu einer effizienten mikrobiellen Elektrosynthese von Acetat in einem BES eingesetzt (Nevin *et al.*, 2010, 2011). Hierbei wurden die Organismen der *Sporomusa*-Gattung in einem kathodischen Kompartiment eines Zwei-Kammer-BES kultiviert, und hohe Acetatproduktionsraten aus den Edukten CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> wurden detektiert (Kap. 2.1). Für *Sporomusa* Arten, stellt Wasserstoff den präferierten Elektronendonator dar, der mit CO<sub>2</sub> als terminalem Elektronenakzeptor zu Acetat oxidiert wird. Allerdings wurde auch die Fermentation von kurzkettigen Alkoholen wie Ethanol, Propanol oder Butanol, sowie eine Reihe weiterer Moleküle zu dem Fermentationsprodukt Acetat beschrieben, was ein sehr großes Substratspektrum der *Sporomusa*-Gattung aufzeigt (Möller *et al.*, 1984). Da alle in dieser Arbeit generierten Stromdichten von einer mikrobiell katalysierten Acetatoxidation zu CO<sub>2</sub> abhängen (vgl. Abb. S1), sollte gerade im Bereich der Anode die CO<sub>2</sub>-Konzentration des Systems am höchsten sein. Die transferierten Elektronen sorgen an der Kathode für eine Wasserstoffproduktion, weswegen die Kathode den optimalen Wachstumsbereich für homoaceteogene Bakterien darstellt. Hier könnte, von den EAB produziertem CO<sub>2</sub> und der an der Kathode generierte Wasserstoff zur Acetatsynthese genutzt werden. Die Synthese weiterer VFAs könnte für eine Kontamination der Kultivierungen durch Bakterien der *Clostridium*-Gattung sprechen (Atasoy & Cetecioglu, 2021). 2013 wurde von Babu *et al.* eine hohe VFA-Synthese in mischkulturellen MEC-Systemen nachgewiesen, wobei der Anstieg der Fettsäurekonzentrationen dem Metabolismus der Clostridien zugeschrieben wurde (Babu *et al.*, 2013).

Aus diesen Gründen wurde die phylogenetische Diversität der Kultivierungen Des3B und Geo1B mittels 16S-Amplikon Sequenzierung (Kap. 3.4) analysiert. Durch ein spezialisiertes Labor (IMA, Karlsruhe, DE) wurden die für die Anzucht beider Zielorganismen verwendeten Gefrierkulturen, der anodische und kathodische Biofilm sowie die planktonische Zellmasse beider Fließzellen analysiert (Tab. 9). Die Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen 26 und 27 dargestellt. Die taxonomische Klassifizierung erfolgt in den Bildbereichen **A** nach den taxonomischen Klassen und in **B** nach den jeweiligen Arten.



**Abb. 26: Taxonomische Klassifikation der 16s-Amplikon Sequenzierung der *D. acetexigens* Kultivierung Des3B.**

Dargestellt ist in A die Klassen- und B Spezies-Ebene. Die Proben wurden aus den, für die bakterielle Anzucht genutzten Gefrierkulturen, dem anodischen und kathodischen Biofilm, sowie der planktonischen Zellmasse aus den mikrobiellen Fließzelle entnommen.



**Abb. 27: Taxonomische Klassifikation der 16s-Amplikon Sequenzierung der *G. sulfurreducens* Kultivierung Geo1B.**

Dargestellt ist in A die Klassen- und B Spezies-Ebene. Die Proben wurden aus den, für die bakterielle Anzucht genutzten Gefrierkulturen, dem anodischen und kathodischen Biofilm, sowie der planktonischen Zellmasse aus den mikrobiellen Fließzelle entnommen.

Die taxonomischen Klassifikationen (Des3B, Abb. 26; Geo1B, Abb. 27) zeigen, dass in den anodischen, kathodischen und planktonischen Proben der bioelektrochemischen Kultivierungen Des3B und Geo1B eine hohe Abundanz unterschiedlicher Kontaminanten aufzufinden ist. Betrachtet man die zur Anzucht genutzten Gefrierkulturen, so ist bei *D. acetexigens* (Abb. 26B) von einer Reinkultur (> 99,5% relative Abundanz), bei *G. sulfurreducens* jedoch von einer Clostridien-Kontamination (< 5 % relative Abundanz) auszugehen. Diese Kontamination spricht schon vor Des1B-Inokulation für eine Clostridien-Kontamination, weshalb hiermit die ebenfalls hohe Abundanz der Clostridien im anodischen Biofilm (< 20 %, Abb. 27A) und in der planktonischen Zellmasse (< 50 %) von Geo1B erklärt werden kann. Auch sind Clostridien in den aus Des3B-entnommenen Sequenzierungsproben enthalten. Da Clostridien die Kohlenstoffquelle Acetat für eine effektive Synthese von VFAs nutzen können, (vgl. Seite 64) könnten diese Bakterien für die Synthese von Propionat, Butyrat und Valeriansäure in Des3B und Geo1B (vgl. Abb. 25) verantwortlich sein (Babu *et al.*, 2013; Atasoy & Cetecioglu, 2021). Einige Clostridienarten wurden schon im Zusammenhang mit ihrer elektrochemischen Redox-Aktivität beschrieben (Kostka *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2001; Rabaey *et al.*, 2004). Hier wurde nachgewiesen, dass Clostridien zur effektiven VFA-Synthese nach Elektronenaufnahme an der Kathode in MFC-Systemen (Kap. 1.2) befähigt sind. Ebenfalls wurden mehrere Stämme der Gattung *Clostridium* mit einem engen Verwandtschaftsgrad, der sog. Gruppe *Clostridium* sensu stricto (Fuchs *et al.*, 2022) als stark abundante Bakterien in dem anodischen Biofilm einer MEC (Kap. 1.2) nachgewiesen, in der Spezies der *Desulfuromonadia*-Klasse (*Geobacter* sp.) Hauptakteure der anodischen Respiration darstellten (Rabaey *et al.*, 2004). Es wird vermutet, dass manche Bakterienstämme der *Clostridium* sensu stricto Gruppe einen Teil der transferierten Elektronen von anodisch respirativen Bakterien wie *Geobacter* sp. abgreifen können, um sie als Elektronendonator zu nutzen (Rabaey *et al.*, 2004; Rago *et al.*, 2017). In Des3B und Geo1B konnten jeweils taxonomisch näher nicht klassifizierbare Stämme der Gruppe *Clostridium* sensu stricto (Cluster-12, Des3A, Abb. 27B bzw. Cluster 16, Geo1B, Abb. 28B) mit einer relativen Abundanz von ca. 2,2 % in dem kathodischen Biofilm (Geo1B) und 2 % (Des3B) bis 20% (Geo1B) in der planktonischen Zellmasse identifiziert werden. Da jedoch in den anodischen Biofilmen von Des3B und Geo1B keine Bakterien der *Clostridium* sensu stricto Gruppe nachgewiesen wurden (vgl. Abb. 26B, Abb. 27B) ist von einem direkten Abgreifen der transferierten Elektronen des anodischen Biofilms (siehe oben) abzusehen (Kracke *et al.*, 2015). In beiden Kultivierungen konnte auch die Präsenz unterschiedlicher Bakterien, der *Alphaproteobacteria*-Klasse identifiziert werden, welche sich in Des3B (< 30,5 %) und Geo1B (< 5 %) hauptsächlich im kathodischen Biofilm angesiedelt haben. Hierbei handelt es sich um Bakterien der Familie *Rhizobiaceae*: *Rhizobium* sp. B3016 und *Agrobacterium skienewicense* (Abb. 26B, Abb. 27B). Da bisher nur wenige Nachweise über *Rhizobiaceae*-Bakterien in anaeroben, MEC-Systemen veröffentlicht wurden, wird auf diese Bakterien im Folgenden nicht weiter eingegangen. Betrachtet man die untersuchten anodischen Biofilme, so konnte in Des3B und Geo1B eine starke Dominanz der Zielorganismen nachgewiesen werden (Des3B, > 38 %; Geo1B > 61,5 %). In Des3B war der, am zweit stärksten vertretene Organismus, taxonomisch

der *Negativicutes*-Klasse (26,5 %) zuzuschreiben. Dieses Bakterium ist im kathodischen Biofilm von Des3B (39 %) und Geo1B (35 %) vertreten und stellt den Organismus mit der höchsten relativen Abundanz dar. Mit Blick auf die taxonomische Spezies-Ebene der *Negativicutes*, wurde in beiden Kultivierungen *Sporomusa sphaeroides* DSM 2875 als homoacetogenes, elektrosynthetisches Bakterium nachgewiesen. Eine genaue Beschreibung des Metabolismus der *Sporomusa*-Gattung findet sich im oberen Abschnitt auf Seite 64. Anders als in Des3B konnte in Geo1B die Präsenz des Zielorganismus auch in dem kathodischen Biofilm nachgewiesen werden. Dies lässt sich auf die Nutzung von kathodisch produzierten Wasserstoff als alternativen Elektronendonator von *G. sulfurreducens* zurückführen (vgl. Kap. 2.4.1) (Engel *et al.*, 2019; Edel *et al.*, 2022; Sapireddy *et al.*, 2021). Da *D. acetexigens* nicht im kathodischen Biofilm nachgewiesen werden konnte (relative Abundanz < 2 %), spricht auch dies für die Unfähigkeit von *D. acetexigens* Wasserstoff als Elektronendonator zu nutzen (Finster *et al.*, 1994; Sapireddy *et al.*, 2021). Betrachtet man alle in beiden Systemen nachgewiesenen Bakterienarten, so konnte durch Literaturrecherche festgestellt werden, dass die Zielorganismen *D. acetexigens* und *G. sulfurreducens* die einzigen bisher beschriebenen elektroaktiven Bakterien in den sequenzierten Proben darstellen. Somit können die generierten Stromdichten nur katalytischen Aktivität und dem extrazellulären Elektronentransfer von *D. acetexigens* bzw. *G. sulfurreducens* zugeschrieben werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Acetatproduktion in beiden Systemen (Des3B; Geo1B) auf die Acetogenese von *Sporomusa sphaeroides* (Nevin *et al.*, 2011; Möller *et al.*, 1984), sowie die Synthese unterschiedlicher VFAs durch *Clostridium*-Kontaminanten zurückzuführen sein könnte (Babu *et al.*, 2013; Atasoy & Cetecioglu, 2021). Unter der Annahme, dass Acetat die einzige im Medium enthaltene und direkt umsetzbare Kohlenstoffquelle darstellt, kann jedoch nicht erklärt werden, weshalb die am Ende der Kultivierungen gemessenen von Acetatkonzentrationen höher als zu Beginn der Kultivierungen waren (vgl. Tab. 14). Dies weist auf eine zusätzliche, im System enthaltene und zur Acetatproduktion genutzte Kohlenstoff- und Elektronenquelle hin.

## Alternative Kohlenstoffquellen

Durch den Ausschluss von CO<sub>2</sub> aus der Flüssigphase des Mediums zu Beginn jeder Kultivierung mittels N<sub>2</sub> - Begasung (24 h; vgl. Kap. 3.5.1) können die dargestellten Experimente als geschlossene Systeme betrachtet werden, in denen zu Beginn kaum gelöstes CO<sub>2</sub> enthalten war. Auch der Kohlenstoffanteil der in diesen Experimenten aktiv zugegebenen C-Quellen (10 mM Acetat, 10 mL Vitaminlösung, 1 mL Cas-Aminosäuren) reicht nicht für die festgestellte Zunahme an organischem Kohlenstoff (vorrangig als Acetat) aus. Dementsprechend wurde der kohlenstoffhaltige HEPES pH-Puffer durch einen Phosphat pH-Puffer (Tab. 8) in Duplikat Des3AB und Geo1AB ersetzt. Allerdings konnte dennoch eine Zunahme der VFA-Konzentrationen in unverändertem Maße detektiert werden, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass der HEPES Puffer auch in den Experimenten zuvor nicht als C-Quelle genutzt wurde.

Die einzige mögliche, bisher in der Arbeit noch nicht beschriebenen Kohlenstoffquelle, die zur Acetatproduktion genutzt hätte werden können, stellt Ethanol (EtOH) dar. EtOH könnte dem System bei steriles Fließzellaufbau, sowie dem Einbau von nicht autoklavierbaren Systemkomponenten (pH-Sensor, Referenzelektrode) in geringer Menge (1 - 3 mL) zugefügt worden sein. Da etwa 4 - 6 Sprühstöße einer ethanolhaltigen (70 %; v/v) Spritzflasche beim Aufbau des Systems verwendet wurden, wurde mittels einer Feinwaage das Gewicht eines Sprühstoßes der 70 %igen EtOH-Lösung ermittelt. Die Messung ergab, dass ein Sprühstoß 600 mg Flüssigkeit enthält. Somit würden insgesamt vier Sprühstöße auf pH-Sensor, Referenzelektrode oder Gewindestücke der Fließzellenperipherie ausreichen, um dem System ca. 2,4 g 70% EtOH einzutragen, was bei einem Volumen des Mediums von 850 mL eine Konzentration von etwa 40 mM (42,9 mM) EtOH zu erreichen. Eine Möglichkeit zum Nachweis von Ethanol im Versuch stellt die Gaschromatographie (Kap. 3.6.2) dar. Das Mindestprobenvolumen des in dieser Arbeit verwendeten Gaschromatographen beträgt 21 mL (Kap. 3.6.2). Da Ethanol erst im Laufe dieser Arbeit als mögliche umgesetzte Kohlenstoffquelle in Betracht gezogen wurde, entsprach dieses Mindestprobenvolumen nicht den üblicherweise entnommen Probenvolumina von 2 - 5 mL. Dennoch wurden einige Proben jeder bioelektrochemischen Duplikat-Kultivierung (Des2AB, Des3AB, Geo1AB) verdünnt und die enthaltene EtOH-Konzentration mittels Gaschromatographie bestimmt. Hierbei muss jedoch erwähnt werden, dass EtOH ein sehr flüchtiges Lösungsmittel ist (Tsachaki *et al.*, 2008) und bei einer Lagerung der Proben über mehrere Monate, sowie mehrmaligem Öffnen und Schließen der Probengefäße hätte aus den Proben entweichen können. Somit sollten die im Anhang (Tab. S5) dargestellten EtOH-Konzentrationen der Kultivierungen nur als Indiz für die Präsenz von Ethanol im System und nicht als absolute Werte gesehen werden. In allen Duplikat-Kultivierungen von *D. acetexigens* und *G. sulfurreducens* konnten EtOH-Konzentrationen zwischen 1,6 mM – 28mM nachgewiesen werden (vgl. Tab. S5). In der Literatur wurde die Fähigkeit Ethanol zu Acetat zu vergären bisher weder für *D. acetexigens* noch für *G. sulfurreducens* beschrieben (Viulu *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2021).

### Ethanol-Vergärung

Bei einer direkten Vergärung von EtOH zu Acetat ist von folgender stöchiometrischen Gleichung (16) auszugehen (Madigan *et al.*, 2020):

#### stöchiometrische Gleichung der Ethanolvergärung

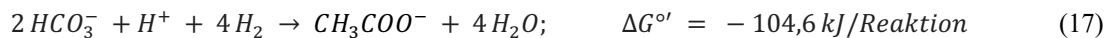


Ersichtlich ist, dass die freie Enthalpie oder Gibbs-Energie der Reaktion, unter Standardbedingungen ( $\Delta G^0'$ ; Konzentration 1 M oder 1 atm; pH = 7) positiv ist; diese Reaktion ist damit endergon, sodass ein Wachstum nur mit diesem Substrat, Ethanol als alleinigem Substrat unter Standardbedingungen nicht

möglich wäre (Madigan *et al.*, 2020). In der Literatur wird als Beispiel für natürliche Ethanol-Vergärungen die Syntrophie eines Ethanol zu Acetat vergärenden Bakteriums (Syntrophen) mit einem methanogenen Bakterium dargestellt (Fuchs *et al.*, 2022; Madigan *et al.*, 2020). Hierbei wird das, von dem Syntrophen bei der EtOH-Fermentation gebildete Produkt H<sub>2</sub> und verfügbares CO<sub>2</sub> zur Methanogenese des Syntrophe-Partners genutzt. Somit wird das Produkt Wasserstoff konstant auf sehr geringem Niveau gehalten, was die Reaktionsgeschwindigkeit, sowie die gesamte freie Energie dieser syntrophen Reaktion in einen negativen, also exergonen Bereich bringt. Dieses Phänomen wird als syntropher Wasserstofftransfer beschrieben (Madigan *et al.*, 2020).

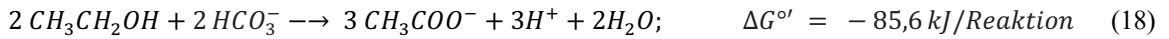
Wie festgestellt (vgl. Abb. 26 B, Abb. 27 B) bestand in den Kultivierungen eine mischkulturelle Diversität, wobei *Sporomusa sphaeroides* eine starke Dominanz im kathodischen Biofilm aufweist. Wie bereits beschrieben (vgl. Seite 64), ist eine Vergärung von Ethanol zu Acetat durch *Sporomusa sphaeroides* möglich (Möller *et al.*, 1984). Es kann außerdem davon ausgegangen werden, dass neben Ethanol und Acetat in den in dieser Arbeit durchgeföhrten Kultivierungen ausgehend von der Acetatoxidation, eine hohe CO<sub>2</sub>-Konzentration im Medium vorliegen sollte (vgl. Tab. S5). Dieses CO<sub>2</sub> kann als terminaler Elektronenakzeptor von *S. sphaeroides* reduziert werden, wobei Wasserstoff den präferierten Elektronendonator der Reaktion darstellt (Thauer *et al.*, 1977; Möller *et al.*, 1984; Aryal *et al.*, 2017). Diese Reaktion folgt dem reduktiven Acetyl-CoA-Weg (Wood-Ljundahl), wie durch folgende stöchiometrische Gleichung (17) beschrieben (Breznak, 2006; Thauer *et al.*, 1977):

stöchiometrische Gleichung der Homoacetogenese in *Sporomusa sphaeroides*



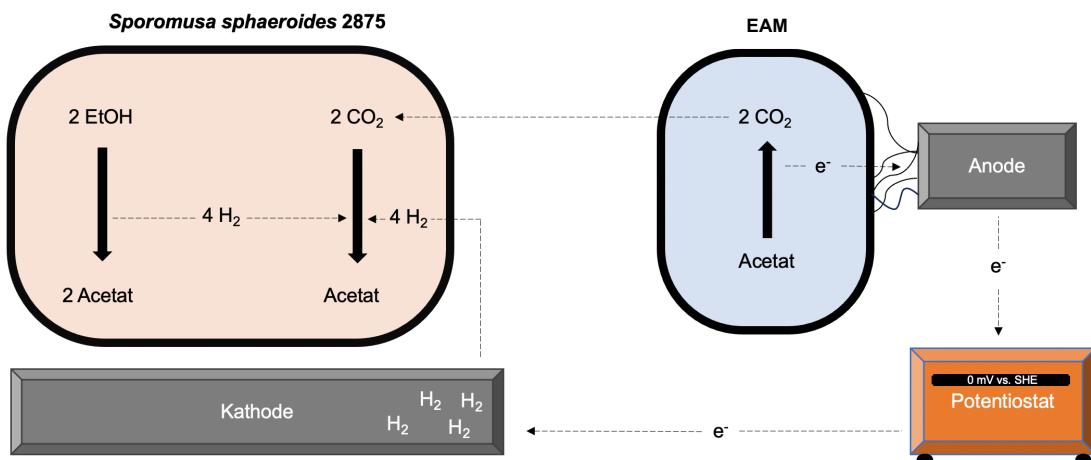
Wenn die Reaktion der Ethanol-Vergärung sowie die Acetogenese summiert werden (18), kann die Gesamtreaktion als exergon eingestuft werden:

gekoppelte Reaktion in einer Mischkultur



Um die Vergärung von Ethanol zu Acetat von einer endergonen Reaktion in eine exergone Reaktion zu wandeln, müsste das reaktionslimitierenden Produkt, Wasserstoff, direkt als Elektronendonator zur CO<sub>2</sub> - Fixierung (Acetogenese, Formel 17) genutzt werden (Thauer *et al.*, 1977; Seitz *et al.*, 1990). Da das System bezüglich eines externen CO<sub>2</sub> – Eintrags als geschlossen betrachtet werden kann (siehe oben), hängt die CO<sub>2</sub>-Konzentration direkt von der respiratorischen Effizienz von *D. acetexigens* bzw. *G. sulfurreducens* ab und steigt erst im Laufe der Kultivierungen an. Somit ist die EtOH-Vergärung von *Sporomusa sphaeroides* direkt abhängig von dieser, durch die Zielorganismen beeinflusste CO<sub>2</sub>-

Konzentration im Medium (Madjarov *et al.*, 2022). Da hier von einer direkten metabolischen Interaktion (Summers *et al.*, 2010; Dolfing, 2014), unterschiedlicher Bakterienspezies ausgegangen wird, kann von einer bisher nicht publizierten, syntrophen Ethanol-Vergärung in einem BES ausgegangen werden. Eine schematische Darstellung dieser Gesamtreaktion ist in Abb. 28 dargestellt.

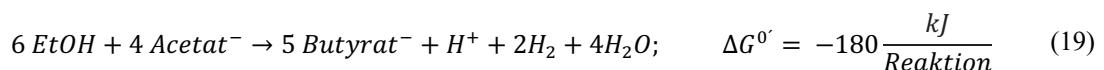


**Abb. 28: Schematische Darstellung der syntrophen EtOH-Vergärung zwischen *Sporomusa sphaeroides 2875* und elektroaktiven, Acetat zu CO<sub>2</sub> oxidierenden Mikroorganismen (EAM).**

Diese syntrophe Ethanol-Vergärung könnte damit auch erklären, weshalb die Acetatkonzentration aller bioelektrochemischen Kultivierungen erst nach einer längeren Zeit in den Aufwärtstrend gerät (vgl. Abb. 25). Allerdings muss mit in Betracht gezogen werden, dass in den zur Anzucht genutzten Gefrierkulturen kein *Sporomusa sphaeroides* enthalten war (vgl. Abb. 26), weswegen von einer geringen Abundanz dieses Bakteriums zum Zeitpunkt des Reaktorstarts auszugehen ist. So kann auch die Adoptionsphase von *Sporomusa* als Erklärung der erst später einsetzenden Acetatproduktion gesehen werden.

Eine andere Art der Ethanol-Vergärung, bekannt als Kettenverlängerung (engl. *chain elongation*), wurde 1945 von Barker *et al.* beschrieben und wird heute in der wissenschaftlichen Literatur hauptsächlich mit *Clostridium kluyveri* veranschaulicht (Barker *et al.*, 1945). Die Kettenverlängerung folgt der unten dargestellten stöchiometrischen Gleichung (19). Zur Übersichtlichkeit wird die Capronat (C6)- und Caprylat (C8)-Produktion nicht dargestellt (Buckel & Thauer, 2018).

#### stöchiometrische Gleichung der Kettenverlängerung durch *Clostridium kluyveri*

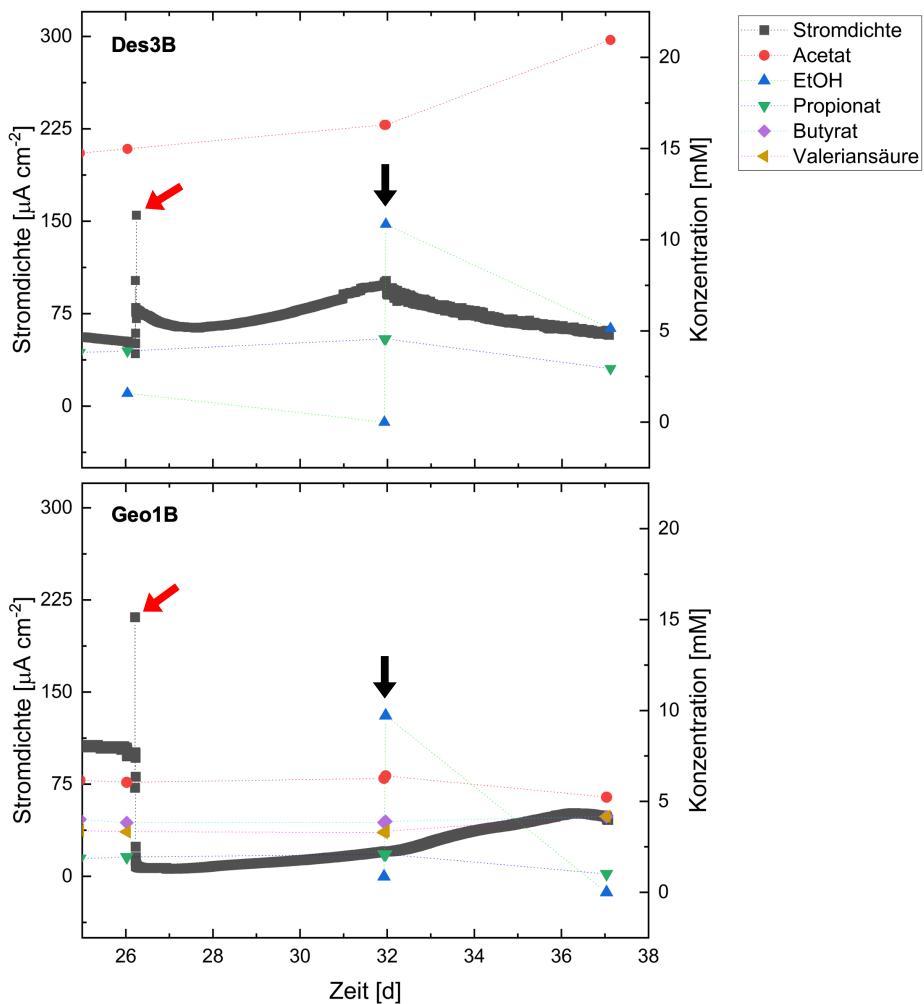


*Clostridium kluyveri* gehört phylogenetisch zur Gruppe der *Clostridium* sensu stricto innerhalb der Gattung *Clostridium* (Cruz-Morales *et al.*, 2019). Der Metabolismus dieses Bakteriums umfasst sowohl die Ethanol-Fermentation als auch die reverse Beta-Oxidation (Zhu *et al.*, 2015). Bei der reversen Beta-Oxidation kann Acetyl-CoA (C2) zu langkettigeren Fettsäuren wie Butyrat (Butansäure; C4), Capronat (Hexansäure; C6) oder Caprylat (Oktansäure; C8) verknüpft werden (Fuchs *et al.*, 2022; Spormann, 2023). Für einen genaueren Einblick ist Scarborough *et al.* (2020) heranzuziehen.

Diese Fettsäuren können als Energiequelle, Kohlenstoffquelle für den Biomasseaufbau oder als Energiespeicher genutzt werden (Courtney *et al.*, 2023). Quintela *et al.* (2024) zeigte, dass die reverese Beta-Oxidation bei einem Überschussmetabolismus von Clostridiens auch als Elektronensenke der Ethanol oxidation dienen kann, wobei überschüssige Elektronen durch die Sekretion von Fettsäuren abgeführt werden können. Da in Des3B und Geo1B eine Abundanz von taxonomisch nicht näher klassifizierbaren Bakterien der *Clostridium* senso stricto Gruppe nachgewiesen wurden, könnten hier Bakterien enthalten sein, welche die oben beschriebenen Stoffwechselwege ausführen könnten. Dies legt die Vermutung nahe, dass diese biochemischen Reaktionen zur beobachteten Butyratproduktion in Geo1A und Geo1B beigetragen haben könnten (Cruz-Morales *et al.*, 2019; Izadi *et al.*, 2020; Usman *et al.*, 2022).

Mittels des Programms *EnzymeDetector* (<https://ed.brenda-enzymes.org/result.php?taxid=38815>, aufgerufen am 14.05.2024) wurde auch in dem Zielorganismus *D. acetexigens* eine Präsenz der, für die EtOH-Fermentation benötigten Enzyme (EC 1.1.1.1; EC 1.2.1.10) nachgewiesen. Allerdings kann in der Kultivierung Des1 (Kap. 4.2.1) ein EtOH-Eintrag nicht komplett ausgeschlossen werden. Da hier jedoch die Stromdichte direkt mit der Acetatoxidation korreliert (vgl. Kap. 4.2.1), wird davon ausgegangen, dass in dieser Kultivierung die direkte Konversion von EtOH in Acetat, sowie die Nutzung von EtOH als Elektronendonator von *D. acetexigens* keine signifikante Rolle gespielt haben. Für eine Bestätigung dieser Hypothese könnte *D. acetexigens* als Reinkultur in zukünftigen Experimenten mit EtOH als einzigm Elektronendonator bioelektrochemisch kultiviert werden.

Nach der Detektion von Ethanol im System sollte durch eine aktive EtOH-Zugabe in Des3B und Geo3B kontrolliert werden, ob die Acetatkonzentration nach EtOH-Zugabe merklich ansteigt, und ob somit eine mögliche Substratkonversionsrate von Ethanol zu Acetat kalkulierbar wäre. Hierfür wurden Des3B und Geo1B 32 Tage nach Inokulation mit 1 mL 70 %igen Ethanols versetzt. Tag 32 wurde als EtOH-Injektionszeitpunkt gewählt, da 6 Tage zuvor (Tag 26, vgl. Tab S5) eine nur sehr geringe verbliebene EtOH-Konzentration von 1,6 mM (Des3B) und 0 mM (Geo1B) nachgewiesen wurde. Betrachtet man die hohe EtOH-Konzentration in Des1B an Tag 14 (28 mM), konnte von einer schnellen EtOH-Abbaurate und Umwandlung von EtOH in Fermentationsprodukte bis zum Tag 32 ausgegangen werden. In Abb. 29 ist die Konzentration der ermittelten VFA- und EtOH-Konzentrationen sowie die Stromdichte von Des3B und Geo1B ab dem Tag 25 nach Inokulation, einen Tag vor pH-adjustierung beider Kultivierungen dargestellt (vgl. Kap. 4.2.1).



**Abb. 29: Experiment zum Nachweis der Ethanol-Vergärung in den Kultivierungen Des3B und Geo1B.** Die in Kapitel 4.2.2 beschriebene pH-Adjustierung erfolgte an Tag 26 (mit rotem Pfeil markiert), während die gezielte Zugabe von Ethanol erfolgte an Tag 32 (mit schwarzem Pfeil markiert).

In Des3B wurde nach der Ethanolzugabe (Tag 32) bis zur nächsten Probenentnahme (Tag 37) eine Abnahme der Ethanolkonzentration von 10,8 mM auf 5,1 mM detektiert, während die Acetatkonzentration in dieser Zeit um etwa 4,6 mM anstieg. Fügt man dieser Konzentration noch die aus der Stromdichte ermittelte (siehe oben) umgesetzte Netto-Acetatkonzentration von 0,83 mM hinzu, kann von einer Acetatproduktion von 5,4 mM ausgegangen werden. Auch ist ersichtlich, dass nach der Ethanolzugabe die Propionatkonzentration um 1,5 mM abgenommen hat. Hierbei kann nicht erklärt werden über welchen metabolischen Weg oder von welchem Stamm der bakteriellen Gemeinschaft (vgl. Abb. 26) der Propionatabbau katalysiert wurde und ob es eine Wechselwirkung mit der Ethanol-Vergärung gibt. In Geo1B konnte nach der Ethanolzugabe an Tag 32 eine Konzentration von ca. 10 mM Ethanol nachgewiesen werden, an Tag 37 wurde allerdings kein Ethanol mehr im Medium detektiert. Zudem nahmen die in dieser Zeit ermittelten Acetat- und Propionatkonzentrationen um 0,8 mM bzw. 1 mM ab, während die Valeriansäure- und Butyratkonzentrationen etwa um 0,8 mM bzw. 0,3 mM zunahmen. Zwischen der Ethanolzugabe und dem Ende der Kultivierung wurde in Geo1B eine

Stromdichte generiert, die einem Abbau von Acetat von etwa 0,44 mM entspricht. Da auch eine Umwandlung der abgebauten Fettsäuren (Acetat und Propionat) in Butyrat oder Valeriansäure möglich wäre, kann auf Grundlage dieser Ergebnisse nach der pH-Adjustierung von Geo1B (vgl. Kap. 4.2.2) nicht direkt auf eine Vergärung von Ethanol zu Acetat geschlossen werden. Eine exakte Bilanzierung, wie viel Ethanol in Acetat umgewandelt wurde, ist somit auf Basis dieses Experimentes nicht ablesbar. Jedoch kann aufgrund der starken Acetatzunahme (+5,4 mM) bei nahezu äquivalenter Reduktion der Ethanolkonzentration (-5,7 mM) in Des3B ein erneuter Nachweis der Ethanolvergärung interpretiert werden.

Um zu analysieren, ob die Acetat-Konzentration auch ohne im System enthaltenes Ethanol im Laufe eines Experiments ansteigt, wurde die bioelektrochemische Kultivierung Des4 als Negativkontrolle der oben beschriebenen syntrophen EtOH-Vergärung durchgeführt. Bei dem Aufbau der Fließzelle, der Medien-Präparation und der Zell-Aufbereitung (Kap. 3.5) vor Inokulation, wurde darauf geachtet, kein Ethanol in das System einzutragen. Alle steril durchzuführenden Schritte inklusive der Probenentnahme wurden unter Nutzung einer Bunsenbrennerflamme durchgeführt. *D. acetexigens* wurde bei einem anodischen Potential von 0 mV vs. SHE kultiviert, und mit einer Zelldichte von  $OD_{600} = 0,12$  inokuliert (Kap. 3.7). Im oberen Teil der Abbildung 30 sind die Stromdichte, das mittlere Biovolumen ( $\overline{BV}_{ABC}$ ) und der Bedeckungsgrad (SC) über die Kultivierungszeit von 18 Tagen dargestellt, im unteren Teil die Konzentrationen von Acetat und Ethanol. Auf eine genaue Beschreibung der Biofilmmorphologie in Des4 wird nicht eingegangen, da sie sich mit den in Kap. 4.2. beschriebenen Beobachtungen deckt.

Wie erwartet konnte in Des4 eine konstante Abnahme der Acetat-Konzentration von 10,2 mM auf 6,3 mM festgestellt werden, woraus sich eine CE (Kap. 3.7.1) von 2,06 errechnen lässt. Im Gegensatz zu der bioelektrochemischen Kultivierung Des1 ( $CE = 0,956 \pm 0,032$ ; vgl. Kap. 4.2.1), sowie weiteren in der Literatur beschriebenen Kultivierungen von *D. acetexigens* Reinkulturen in MECs ( $CE = 0,98 \pm 0,02$ ) (Katuri *et al.*, 2020; Sapireddy *et al.*, 2021) ist die CE in Des4 atypisch hoch ausgefallen. Daher erscheint es fraglich, ob es sich wirklich um eine *D. acetexigens* Reinkultur handelt. Die Anzucht der in Des4 genutzten bakteriellen Kultur wurde nicht erneut aus einer Gefrierkultur angeimpft, sondern aus der, für die Des3B Inokulation genutzten Flüssigkultur rekultiviert. Somit kann in Des4 von einer ähnlichen Kontamination wie in Des3B ausgegangen werden (vgl. Abb. 26). In dieser bakteriellen Gemeinschaft war das homoacetogene Bakterium *S. sphaeroides* (siehe oben) enthalten, weswegen eine Acetogenese bei CO<sub>2</sub>-Fixierung unter Nutzung des kathodisch generierten Wasserstoff (Aryal *et al.*, 2017) in Des4 sehr wahrscheinlich ist. Da in Des1 jedoch direkt aus der Gefrierkultur (vgl. Abb. 26A) angeimpft wurde und sich die in der Kultivierung bestimmte CE von 0,956 im Rahmen schon publizierter CEs bewegt, kann in Des1 von einer monokulturellen *D. acetexigens* bioelektrochemischen Kultivierung ausgegangen werden.

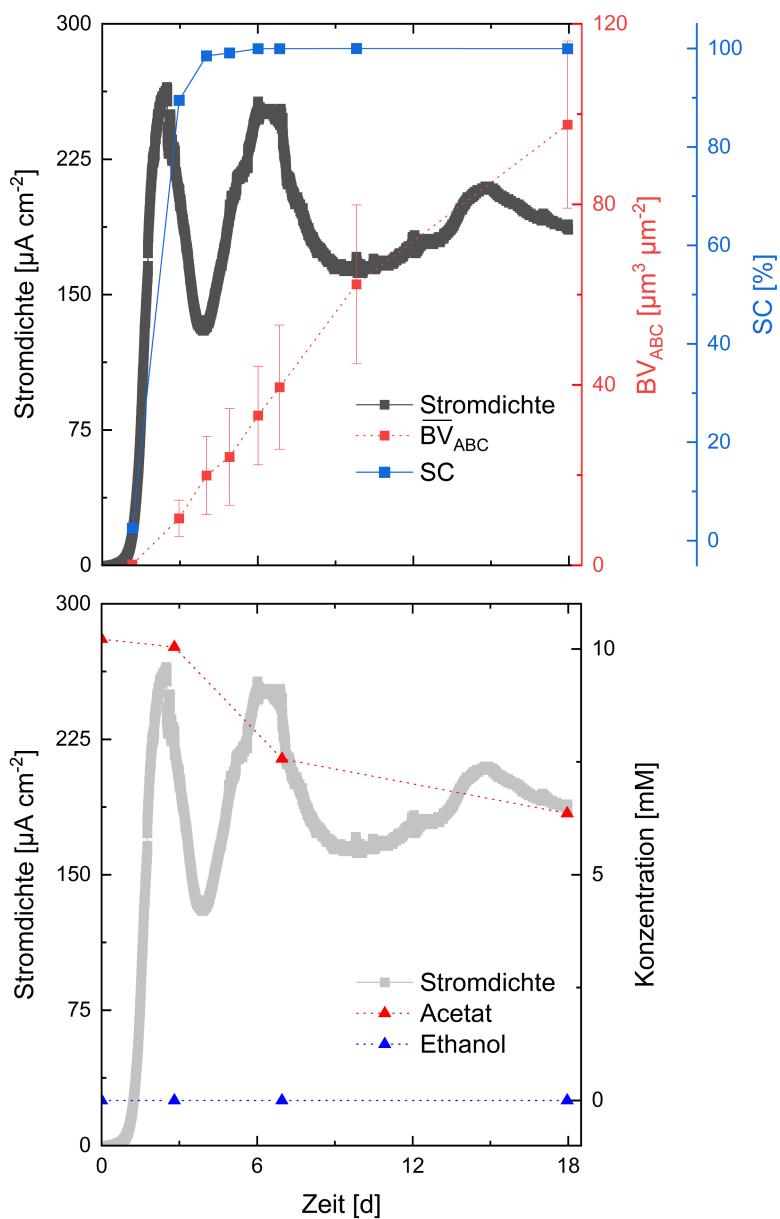


Abb. 30: Kultivierung von *D. acetexigens* (Des4): Negativkontrolle ohne Ethanoleintrag.

Unter der Bedingung, dass zu Beginn der Kultivierung Des4 kein CO<sub>2</sub> im Medium enthalten war, kann aus dieser Kultivierung eine Konversion von CO<sub>2</sub> zu Acetat in einem Verhältnis von ca. 1 : 2 nachgewiesen werden. Berechnet man aus der Stromdichte von Des4 die damit verknüpfte netto Acetatoxidation, so ist ersichtlich, dass 7,2 mM Acetat hätten oxidiert werden müssen. Da die Acetatkonzentration über die gesamte Kultivierungszeit jedoch nur um 3,9 mM abgenommen hat (vgl. Abb. 30), ist es sehr wahrscheinlich, dass homoacetogene Bakterien wie *S. sporomusa* schätzungsweise 45 % des aus dem Acetat gebildeten CO<sub>2</sub> wieder zur Acetogenese genutzt haben.

Betrachtet man die Stromdichte von Des4 über die Zeit, so fällt wie in Des1, Des2A, Des3A und Des3B (vgl. Kap. 4.2, Abb. 25) auf, dass ein Berg-Tal-Berg Verlauf der Stromdichte ausgebildet wurde. Hierbei ist zu beachten, dass Bakterien schnelle metabolische Wechsel (Änderung der Stoffwechselaktivität)

durchlaufen können (V. Stockar, 2010; Korth *et al.*, 2020). Selbst kleine Unterschiede in den Kultivierungsparametern, wie der Temperatur, der Gaszusammensetzung, der Substratkonzentration, der Zelldichte, der mischkulturellen Zusammensetzung oder Unterschiede morphologischer Parameter des Biofilms, wie der Biofilmdicke, dem Biofilmvolumen, dem Bedeckungsgrad, der Rauheit und der Porosität, können dazu führen, dass die Bakterien die initiale katabole Phase (Maximierung der Stoffwechselrate → direkter Anstieg der freigesetzten Elektronen → steigende Stromdichte) schnell verlassen und die hier erzeugte Energie nun in die Biomasseproduktion einfließen lassen können (Korth & Harnisch, 2019; Korth *et al.*, 2020). Dies könnte den Abfall der Stromdichte nach dem ersten Maximum von  $264 \mu\text{A cm}^{-2}$  nach etwa drei Tagen mit einem Bedeckungsgrad der Anode von ca. 80 % in Des4, sowie in Des2A ( $\bar{J}_{max} = 302 \mu\text{A cm}^{-2}$ , SC = 79 %) und Des3 $\overline{\text{AB}}$  ( $\bar{J}_{max} = 252 \mu\text{A cm}^{-2}$ ; SC = 95 %) (vgl. Kap. 4.2.2, Tab. 12) erklären. Auch könnte dieser metabolische Umschwung des jeweiligen Biofilms als Ursache genannt werden, weshalb die maximale Biofilmakkumulationsrate in Des2A und Des3  $\overline{\text{AB}}$  erst mit einer Verzögerung von bis zu 1,7 Tagen auf das Erreichen der jeweiligen maximalen Stromdichte folgte (vgl. Tab. 12, Abb. 14).

Ein erneuter Anstieg der Stromdichte nach Erreichen des Stromdichtetals (Tag 4, Des4, vgl. Abb. 30; Tag 9, Des3, vgl. Abb. 14) könnte wiederum durch den Wechsel von der anabolen zur katabolen Stoffwechselphase, ausgelöst durch den Einfluss oben genannter Parameter, erklärt werden. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die jeweilige Stromdichte direkt die Rate der katabolen Leistung darstellt (V. Stockar, 2010). Die daraus gewonnene Energie kann beispielsweise bei Limitierungen des Elektronenakzeptors (Anode) (Bonanni *et al.*, 2012) durch eine überschrittene optimale Biofilmdicke (vgl. Kap. 4.2.2) oder dem Erreichen eines 100 %igen Bedeckungsgrades (vgl. Hackbarth *et al.*, 2020) von einem Biofilm zwischengespeichert werden. Spätere Veränderungen dieser Parameter könnten erneut einen starken Einfluss auf den Metabolismus des Biofilms haben, sodass die zwischengespeicherte Energie dann in den respiratorischen Stoffwechselweg eingeschleust wird, was in einer ansteigenden Stromdichte ersichtlich wird (Bonanni *et al.*, 2012; Deng *et al.*, 2018).

Durch obige Diskussion wird klar, dass die generierte Stromdichte in einer MEC sowie die Biofilmmorphologie stark mit dem aktuellen Metabolismus eines Biofilms korreliert, welcher von diversen externen Parametern beeinflusst werden kann (Stockar, 2010). Mit Hinblick auf diese Korrelation wäre eine quantitative Expressionsstudie (qPCR) eines elektroaktiven Biofilms zu unterschiedlichen Zeiten des Biofilmwachstums in mikrobiellen Elektrolysezellen hinsichtlich der Expression typischer Gene des Anabolismus bzw. Katabolismus sehr interessant. Auf diese Weise könnte der Einfluss unterschiedlichster Parameter auf das metabolische Verhalten des Biofilms analysiert werden, wodurch optimale Reaktorbedingungen für eine möglichst hohe Stromdichte bestimmt werden könnten. Hierbei sollte untersucht werden, welche Kultivierungsparameter eher den Katabolismus eines elektroaktiven Biofilms ansteuern, womit die respiratorische Leistung und somit die generierte Stromdichte erhöht werden kann (Wagner *et al.*, 2010; Levar *et al.*, 2014; Zacharoff, *et al.*, 2016).

# 5 Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, das bioelektrochemische Verhalten sowie die Biofilmmorphologie des elektroaktiven Deltaprobebakteriums *D. acetexigens* nach Implementierung in mikrobiellen Elektrolysezellen zu analysieren und mit denen des Modellorganismus *G. sulfurreducens* zu vergleichen. Dazu wurden beide Organismen in identischen Fließzellen kultiviert, und die Einflüsse verschiedener Kultivierungsparameter, wie Strömungsgeschwindigkeit oder zugegebene Zelldichte bei der Inokulation auf die Biofilmbildung sowie die generierten Stromdichten analysiert.

Da die Biofilmmorphologie, insbesondere das mittlere Biofilmvolumen sowie der Bedeckungsgrad der Anode, einen großen Einfluss auf die generierte Stromdichte hat, wurden die Biofilme beider Organismen mittels OCT visualisiert. Dabei konnten unterschiedliche Gradienten der Biofilmdicke sowohl in lateraler als auch in longitudinaler Richtung nachgewiesen werden. Ein auffallender Unterschied beider Organismen bestand darin, dass *Geobacter*-Biofilme selbst bei  $15 - 30 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$  größeren Biofilmvolumina (Volumen des Biofilmes bezogen auf die visualisierte Fläche) immer noch die maximale Stromdichte des jeweiligen Kultivierungsverlaufs erreichen konnten. Dieser Unterschied, weshalb *D. acetexigens* Biofilme schon bei vergleichsweise geringeren Biofilmvolumina ( $\overline{BV}_{J_{max}} \approx 10 - 25 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$ ) eine Beeinträchtigung des externen Elektronentransfers erfahren als *Geobacter* Biofilme ( $\overline{BV}_{J_{max}} \approx 40 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$ ), konnte auf Grundlage einer Literaturrecherche erklärt und diskutiert werden. Zudem zeigte sich, dass die zur Inokulation genutzte Zelldichte keinen Einfluss auf die Dauer der Biofilmaadhäsionsphase oder den Eintritt der generierten Stromdichte in die exponentiell steigende Phase hat. Die von *D. acetexigens* Biofilmen produzierte Stromdichte stieg im Durchschnitt nach ca. 4 Tagen Kultivierungszeit rapide an, während dies bei *G. sulfurreducens* Biofilmen erst nach 8 Tagen der Fall war.

Betrachtet man die von *D. acetexigens* und *G. sulfurreducens* generierten maximalen Stromdichten in mikrobiellen Fließzellen ähneln sich diese zwar ( $\bar{J}_{max, Des2B} = 425 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ;  $\bar{J}_{max, Geo1A} = 412 \mu\text{m cm}^{-2}$ ), ein Einfluss auf die Stromdichte durch im anodischen Biofilm abundante Kontaminanten in Form einer konsensialistischen Nutzung der transferierten Elektronen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Aus den Ergebnissen einzelner phylogenetischer Analysen dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass in allen Duplikat-Kultivierungen dieser Arbeit von mischkulturellen Bakteriengemeinschaften ausgegangen werden muss.

Die in den phylogenetisch charakterisierten Kultivierungen ermittelte Produktion kurzkettiger Fettsäuren konnte durch unterschiedliche metabolische Stoffwechselwege von Kontaminanten wie *Sporomusa* oder unterschiedlichen Bakterien der Gattung *Clostridium* erörtert werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wird in dieser Arbeit eine syntrophe Ethanol-Vergärung zwischen dem homoacetogenen Ethanol-Vergärer *Sporomusa sphaeroides* und *D. acetexigens* bzw. *G. sulfurreducens* postuliert.

Trotz mischkultureller Kultivierung konnte nachgewiesen werden, dass die jeweiligen Zielorganismen selbst nach Kultivierungszeiträumen von über 37 Tagen die einzigen elektroaktiven Mikroorganismen des analysierten Konsortiums darstellten. Dies lässt auf eine Nischendominanz dieser elektroaktiven Bakterien in dem anodischen Biofilm der jeweiligen MEC schließen (Katuri *et al.*, 2021).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass *D. acetexigens* im Hinblick auf eine zukunftsorientierten Kreislaufwirtschaft als ein möglicher Biokatalysator von mikrobiellen Elektrolysezellen mit vergleichsweise hohen Wasserstoffausbeuten vorgeschlagen werden kann. Aufgrund der in dieser Arbeit nachgewiesenen Coulomb'schen Effizienz von ca. 0,96 in Monokultur und damit dem erneuten Beleg, dass Wasserstoff nicht als Elektronendonator genutzt wird, weist *D. acetexigens* im Vergleich zu *G. sulfurreducens* ähnliche oder sogar überlegene Eigenschaften als elektrochemischer Katalysator in MECs auf. Auch die in dieser Arbeit erstmalig dokumentierte monokulturelle Biofilmbildung von *D. acetexigens* auf planaren Graphitoberflächen unterstreicht das Potenzial dieses Mikroorganismus, als vielversprechender Kandidaten zur Umwandlung von chemischer in elektrische Energie in bioelektrochemischen Systemen (BES) eingesetzt zu werden.

# 6 Referenzen

- Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., & Lomri, A. (2007). Reactive oxygen species and superoxide dismutases: Role in joint diseases. *Joint Bone Spine*, 74, 324 – 329.
- Aryal, N., Tremblay, P.-L., Lizak, D. M., & Zhang, T. (2017). Performance of different *Sporomusa* species for the microbial electrosynthesis of acetate from carbon dioxide. *Bioresource Technology*, 233, 184 – 190.
- Atasoy, M., & Cetecioglu, Z. (2021). Bioaugmented mixed culture by *Clostridium aceticum* to manipulate volatile fatty acids composition from the fermentation of cheese production wastewater. *Frontiers in Microbiology*, 12, 658494.
- Badwal, S. P. S., Giddey, S. S., Munnings, C., Bhatt, A. I., & Hollenkamp, A. F. (2014). Emerging electrochemical energy conversion and storage technologies. *Frontiers in Chemistry*, 2, 79.
- Baranitharan, E., Khan, M. R., Prasad, D. M. R., Teo, W. F. A., Tan, G. Y. A., & Jose, R. (2015). Effect of biofilm formation on the performance of microbial fuel cell for the treatment of palm oil mill effluent. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38, 15 – 24.
- Barker, H. A., Kamen, M. D., & Bornstein, B. T. (1945). The synthesis of butyric and caproic acids from ethanol and acetic acid by *Clostridium kluyveri*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 31, 373 – 381.
- Bonanni, P. S., Schrott, G. D., Robuschi, L., & Busalmen, J. P. (2012). Charge accumulation and electron transfer kinetics in *Geobacter sulfurreducens* biofilms. *Energy & Environmental Science*, 5, 6188.
- Breznak, J. A. (2006). The genus *Sporomusa*. In: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes* (991 – 1001). Springer US.
- Brown, B., Wilkins, M., & Saha, R. (2022). *Rhodopseudomonas palustris*: a biotechnology chassis. *Biotechnology Advances*, 60, 108001.
- Buckel, W., & Thauer, R. K. (2018). Flavin-based electron bifurcation, a new mechanism of biological energy coupling. *Chemical Reviews*, 118, 3862 – 3886.
- Bundesministerium für Wirtschaft und Klimaschutz (BMWK). (2023). *Erneuerbare Energien in Zahlen 2022*.
- Caccavo, F., Lonergan, D. J., Lovley, D. R., Davis, M., Stolz, J. F., & McInerney, M. J. (1994). *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a hydrogen- and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 3752 – 3759.

- Call, D., & Logan, B. E. (2008). Hydrogen production in a single chamber microbial electrolysis cell lacking a membrane. *Environmental Science & Technology*, 42, 3401 – 3406.
- Carmo, M., Fritz, D. L., Mergel, J., & Stolten, D. (2013). A comprehensive review on PEM water electrolysis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38, 4901 – 4934.
- Cheng, S., & Logan, B. E. (2007). Sustainable and efficient biohydrogen production via electrohydrogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 18871 – 18873.
- Conners, E. M., Rengasamy, K., & Bose, A. (2022). Electroactive biofilms: how microbial electron transfer enables bioelectrochemical applications. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 49 (4), kuac012.
- Cruz-Morales, P., Orellana, C. A., Moutafis, G., Moonen, G., Rincon, G., Nielsen, L. K., & Marcellin, E. (2019). Revisiting the evolution and taxonomy of *Clostridia*, a phylogenomic update. *Genome Biology and Evolution*, 11, 2035 – 2044.
- Deng, X., Dohmae, N., Nealon, K. H., Hashimoto, K., & Okamoto, A. (2018). Multi-heme cytochromes provide a pathway for survival in energy-limited environments. *Science Advances*, 4 (2), eaao5682.
- Dolfing, J. (2014). Syntrophy in microbial fuel cells. *The ISME Journal*, 8 (1), 4–5.
- Edel, M., Philipp, L.-A., Lapp, J., Reiner, J., & Gescher, J. (2022). Electron transfer of extremophiles in bioelectrochemical systems. *Extremophiles*, 26, 31.
- Engel, C., Schattenberg, F., Dohnt, K., Schröder, U., Müller, S., & Krull, R. (2019). Long-term behavior of defined mixed cultures of *Geobacter sulfurreducens* and *Shewanella oneidensis* in bioelectrochemical systems. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 60.
- Filman, D. J., Marino, S. F., Ward, J. E., Yang, L., Mester, Z., Bullitt, E., Lovley, D. R., & Strauss, M. (2019). Cryo-EM reveals the structural basis of long-range electron transport in a cytochrome-based bacterial nanowire. *Communications Biology*, 2, 219.
- Finster, K., Bak, F., & Pfennig, N. (1994). *Desulfuromonas acetexigens* sp. nov., a dissimilatory sulfur-reducing eubacterium from anoxic freshwater sediments. *Archives of Microbiology*, 161, 328 – 332.
- Finster, K., Coates, J. D., Liesack, W., & Pfennig, N. (1997). *Desulfuromonas thiophila* sp. nov., a new obligately sulfur-reducing bacterium from anoxic freshwater sediment. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47, 754 – 758.
- Flemming, H.-C., Baveye, P., Neu, T. R., Stoodley, P., Szewzyk, U., Wingender, J., & Wuertz, S. (2021). Who put the film in biofilm? The migration of a term from wastewater engineering to medicine and beyond. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 7, 10.

- Flemming, H.-C., Neu, T. R., & Wozniak, D. J. (2007). The EPS Matrix: the “house of biofilm cells”. *Journal of Bacteriology*, 189, 7945 – 7947.
- Friedman, E., Miller, K., Lipson, D., & Angenent, L. (2013). Potentiostatically poised electrodes mimic iron oxide and interact with soil microbial communities to alter the biogeochemistry of arctic peat soils. *Minerals*, 3, 318 – 336.
- Fuchs, G., Bramkamp, M., Dersch, P., Eitinger, T., Heider, J., & Kothe, E. (2022). *Allgemeine Mikrobiologie* (H. G. Schlegel, Ed.; 11., vollständig überarbeitete Auflage). Georg Thieme Verlag.
- Geelhoed, J. S., Henstra, A. M., & Stams, A. J. M. (2016). Carboxydrophic growth of *Geobacter sulfurreducens*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 997 – 1007.
- Glasbey, C. A., & Horgan, G. W. (1997). Image analysis for the biological sciences. *Biometrics*, 53, 783.
- Guo, Y., Aoyagi, T., & Hori, T. (2021). Comparative insights into genome signatures of ferric iron oxide- and anode-stimulated *Desulfuromonas* spp. strains. *BMC Genomics*, 22, 475.
- Hackbarth, M., Gescher, J., Horn, H., & Reiner, J. E. (2023). A scalable, rotating disc bioelectrochemical reactor (RDBER) suitable for the cultivation of both cathodic and anodic biofilms. *Bioresource Technology Reports*, 21, 101357.
- Hackbarth, M., Jung, T., Reiner, J. E., Gescher, J., Horn, H., Hille-Reichel, A., & Wagner, M. (2020). Monitoring and quantification of bioelectrochemical *Kyrridia spormannii* biofilm development in a novel flow cell setup. *Chemical Engineering Journal*, 390, 124604.
- Hari, A. R., Katuri, K. P., Gorron, E., Logan, B. E., & Saikaly, P. E. (2016). Multiple paths of electron flow to current in microbial electrolysis cells fed with low and high concentrations of propionate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 5999 – 6011.
- Härrer, D. (2021). Upcycling von Biomasse-Abfallströmen über biotechnologische Reaktionskaskaden. Karlsruhe: Karlsruher Institut für Technologie (KIT).
- Holmes, D. E., Dang, Y., Walker, D. J. F., & Lovley, D. R. (2016). The electrically conductive pili of *Geobacter* species are a recently evolved feature for extracellular electron transfer. *Microbial Genomics*, 2, e00072.
- Hu, Y., Wang, Y., Han, X., Shan, Y., Li, F., & Shi, L. (2021). Biofilm biology and engineering of *Geobacter* and *Shewanella* spp. For Energy Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 786416.
- Ishii, S., Suzuki, S., Norden-Krichmar, T. M., Nealson, K. H., Sekiguchi, Y., Gorby, Y. A., & Bretschger, O. (2012). Functionally stable and phylogenetically diverse microbial enrichments from microbial fuel cells during wastewater treatment. *PLoS ONE*, 7, e30495.

- Ishii, S., Suzuki, S., Norden-Krichmar, T. M., Phan, T., Wanger, G., Nealson, K. H., Sekiguchi, Y., Gorby, Y. A., & Bretschger, O. (2014). Microbial population and functional dynamics associated with surface potential and carbon metabolism. *The ISME Journal*, 8, 963 – 978.
- Izadi, P., Fontmorin, J.-M., Godain, A., Yu, E. H., & Head, I. M. (2020). Parameters influencing the development of highly conductive and efficient biofilm during microbial electrosynthesis: the importance of applied potential and inorganic carbon source. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 6 (1), 40.
- Joshi, S. J., Deshmukh, A., & Sarma, H. (Eds.). (2021). Environmental biotechnology: towards a sustainable future. *Biotechnology for Sustainable Environment*. Springer Singapore.
- Kadier, A., Kalil, M. S., Mohamed, A., & Abdul Hamid, A. (2017). A new design enhances hydrogen production by *G. Sulfurreducens* PCA strain in a single-chamber microbial electrolysis cell (MEC). *Jurnal Teknologi*, 79 (5 – 3).
- Kanematsu, H., & Barry, D. M. (2020). Formation and control of biofilm in various environments. *Formation and control of biofilm in various environments*, 233, Springer.
- Kaplan, J. B. (2010). Biofilm dispersal: Mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *Journal of Dental Research*, 89, 205 – 218.
- Katuri, K. P., Albertsen, M., & Saikaly, P. E. (2017). Draft genome sequence of *Desulfuromonas acetexigens* Strain 2873, a novel anode-respiring bacterium. *Genome Announcements*, 5, e01522-16.
- Katuri, K. P., Kamireddy, S., Kavanagh, P., Muhammad, A., Conghaile, P. Ó., Kumar, A., Saikaly, P. E., & Leech, D. (2020). Electroactive biofilms on surface functionalized anodes: the anode respiring behavior of a novel electroactive bacterium, *Desulfuromonas acetexigens*. *Water Research*, 185, 116284.
- Ketep, S. F., Bergel, A., Bertrand, M., Achouak, W., & Fourest, E. (2013a). Lowering the applied potential during successive scratching/re-inoculation improves the performance of microbial anodes for microbial fuel cells. *Bioresource Technology*, 127, 448 – 455.
- Ketep, S. F., Bergel, A., Bertrand, M., Achouak, W., & Fourest, E. (2013b). Sampling location of the inoculum is crucial in designing anodes for microbial fuel cells. *Biochemical Engineering Journal*, 73, 12 – 16.
- Knoll, M. T., Jürgensen, N., Weiler, J. R., & Gescher, J. (2023). Predictability and robustness of anode biofilm to changing potential in microbial electrolysis system. *Bioresource Technology Reports*, 24, 101640.
- Korth, B., & Harnisch, F. (2019). Spotlight on the energy harvest of electroactive microorganisms: the impact of the applied anode potential. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1352.

- Korth, B., Kretzschmar, J., Bartz, M., Kuchenbuch, A., & Harnisch, F. (2020). Determining incremental coulombic efficiency and physiological parameters of early stage *Geobacter* spp. enrichment biofilms. *PLOS ONE*, 15, e0234077.
- Kostka, J. E., Dalton, D. D., Skelton, H., Dollhopf, S., & Stucki, J. W. (2002). Growth of iron(III)-reducing bacteria on clay minerals as the sole electron acceptor and comparison of growth yields on a variety of oxidized iron forms. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 6256 – 6262.
- Kracke, F., Vassilev, I., & Krömer, J. O. (2015). Microbial electron transport and energy conservation - the foundation for optimizing bioelectrochemical systems. *Frontiers in Microbiology*, 6, 575.
- Lenin Babu, M., Venkata Subhash, G., Sarma, P. N., & Venkata Mohan, S. (2013). Bio-electrolytic conversion of acidogenic effluents to biohydrogen: an integration strategy for higher substrate conversion and product recovery. *Bioresource Technology*, 133, 322 – 331.
- Levar, C. E., Chan, C. H., Mehta-Kolte, M. G., & Bond, D. R. (2014). An inner membrane cytochrome required only for reduction of high redox potential extracellular electron acceptors. *mBio*, 5, e02034-14.
- Li, T., Zhou, Q., Zhou, L., Yan, Y., Liao, C., Wan, L., An, J., Li, N., & Wang, X. (2020). Acetate limitation selects *Geobacter* from mixed inoculum and reduces polysaccharide in electroactive biofilm. *Water Research*, 177, 115776.
- Liang, P., Duan, R., Jiang, Y., Zhang, X., Qiu, Y., & Huang, X. (2018). One-year operation of 1000-L modularized microbial fuel cell for municipal wastewater treatment. *Water Research*, 141, 1 – 8.
- Lin, W. C., Coppi, M. V., & Lovley, D. R. (2004). *Geobacter sulfurreducens* can grow with oxygen as a terminal electron acceptor. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 2525 – 2528.
- Logan, B. E. (2009). Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. *Nature Reviews Microbiology*, 7, 375 – 381.
- Logan, B. E., & Rabaey, K. (2012). Conversion of wastes into bioelectricity and chemicals by using microbial electrochemical technologies. *Science*, 337, 686 – 690.
- Logan, B. E., & Regan, J. M. (2006). Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. *Trends in Microbiology*, 14, 512 – 518.
- Lovley, D. R., Ueki, T., Zhang, T., Malvankar, N. S., Shrestha, P. M., Flanagan, K. A., Aklujkar, M., Butler, J. E., Giloteaux, L., Rotaru, A.-E., Holmes, D. E., Franks, A. E., Orellana, R., Risso, C., & Nevin, K. P. (2011). *Geobacter*. In *Advances in Microbial Physiology*, 59, 1 – 100. Elsevier.
- Lovley, D. R., & Walker, D. J. F. (2019). *Geobacter* protein nanowires. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2078.

- Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., Stahl, D. A., & Brock, T. D. (2020). *Brock Mikrobiologie*, 15, Pearson.
- Madjarov, J., Soares, R., Paquete, C. M., & Louro, R. O. (2022). *Sporomusa ovata* as catalyst for bioelectrochemical carbon dioxide reduction: a review across disciplines from microbiology to process engineering. *Frontiers in Microbiology*, 13, 913311.
- Marratt, S. J., Lowe, T. G., Bye, J., McMillan, D. G. G., Shi, L., Fredrickson, J., Zachara, J., Richardson, D. J., Cheesman, M. R., Jeuken, L. J. C., & Butt, J. N. (2012). A functional description of CymA, an electron-transfer hub supporting anaerobic respiratory flexibility in *Shewanella*. *Biochemical Journal*, 444, 465 – 474.
- Martins, M., Uppuluri, P., Thomas, D. P., Cleary, I. A., Henriques, M., Lopez-Ribot, J. L., & Oliveira, R. (2010). Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms. *Mycopathologia*, 169 (5), 323 – 331.
- Methé, B. A., Nelson, K. E., Eisen, J. A., Paulsen, I. T., Nelson, W., Heidelberg, J. F., Wu, D., Wu, M., Ward, N., Beanan, M. J., Dodson, R. J., Madupu, R., Brinkac, L. M., Daugherty, S. C., DeBoy, R. T., Durkin, A. S., Gwinn, M., Kolonay, J. F., Sullivan, S. A., ... Fraser, C. M. (2003). Genome of *Geobacter sulfurreducens*: metal reduction in subsurface environments. *Science*, 302 (5652), 1967 – 1969.
- Moscoviz, R., De Fouchécour, F., Santa-Catalina, G., Bernet, N., & Trably, E. (2017). Cooperative growth of *Geobacter sulfurreducens* and *Clostridium pasteurianum* with subsequent metabolic shift in glycerol fermentation. *Scientific Reports*, 7 (1), 44334.
- Murga, R., Stewart, P. S., & Daly, D. (1995). Quantitative analysis of biofilm thickness variability. *Biotechnology and Bioengineering*, 45 (6), 503 – 510.
- Möller, B., Oßmer, R., Howard, B. H., Gottschalk, G., & Hippe, H. (1984). *Sporomusa*, a new genus of gram-negative anaerobic bacteria including *Sporomusa sphaerooides* spec. nov. and *Sporomusa ovata* spec. nov. *Archives of Microbiology*, 139 (4), 388 – 396.
- Nealson, K. H., & Saffarini, D. (1994). Iron and manganese in anaerobic respiration: environmental significance, physiology, and regulation. *Annual Review of Microbiology*, 48 (1), 311 – 343.
- Nevin, K. P., Hensley, S. A., Franks, A. E., Summers, Z. M., Ou, J., Woodard, T. L., Snoeyenbos-West, O. L., & Lovley, D. R. (2011). Electrosynthesis of organic compounds from carbon dioxide is catalyzed by a diversity of acetogenic microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (9), 2882 – 2886.

- Nevin, K. P., Kim, B.-C., Glaven, R. H., Johnson, J. P., Woodard, T. L., Methé, B. A., DiDonato, R. J., Covalla, S. F., Franks, A. E., Liu, A., & Lovley, D. R. (2009). Anode biofilm transcriptomics reveals outer surface components essential for high density current production in *Geobacter sulfurreducens* fuel cells. *PLoS ONE*, 4(5), e5628.
- Nevin, K. P., Richter, H., Covalla, S. F., Johnson, J. P., Woodard, T. L., Orloff, A. L., Jia, H., Zhang, M., & Lovley, D. R. (2008). Power output and columbic efficiencies from biofilms of *Geobacter sulfurreducens* comparable to mixed community microbial fuel cells. *Environmental Microbiology*, 10 (10), 2505 – 2514.
- Nevin, K. P., Woodard, T. L., Franks, A. E., Summers, Z. M., & Lovley, D. R. (2010). Microbial electrosynthesis: feeding microbes electricity to convert carbon dioxide and water to multicarbon extracellular organic compounds. *mBio*, 1 (2), e00103-10.
- Nguyen, H. T. T., Le, G. T. H., Park, S.-G., Jadhav, D. A., Le, T. T. Q., Kim, H., Vinayak, V., Lee, G., Yoo, K., Song, Y.-C., & Chae, K.-J. (2024). Optimizing electrochemically active microorganisms as a key player in the bioelectrochemical system: identification methods and pathways to large-scale implementation. *Science of The Total Environment*, 914, 169766.
- Otsu, N. (1979). A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, 9 (1), 62 – 66.
- Park, H. S., Kim, B. H., Kim, H. S., Kim, H. J., Kim, G. T., Kim, M., Chang, I. S., Park, Y. K., & Chang, H. I. (2001). A novel electrochemically active and Fe(III)-reducing bacterium phylogenetically related to *Clostridium butyricum* isolated from a microbial fuel cell. *Anaerobe*, 7 (6), 297 – 306.
- Picioreanu, C., Van Loosdrecht, M. C. M., & Heijnen, J. J. (1998). Mathematical modeling of biofilm structure with a hybrid differential-discrete cellular automaton approach. *Biotechnology and Bioengineering*, 58 (1), 101 – 116.
- Picioreanu, C., Van Loosdrecht, M. C. M., & Heijnen, J. J. (2000). A theoretical study on the effect of surface roughness on mass transport and transformation in biofilms. *Biotechnology and Bioengineering*, 68 (4), 355 – 369.
- Potter, Mi. C. (1911). Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 84 (571), 260 – 276.
- Quan, K., Hou, J., Zhang, Z., Ren, Y., Peterson, B. W., Flemming, H.-C., Mayer, C., Busscher, H. J., & Van Der Mei, H. C. (2022). Water in bacterial biofilms: pores and channels, storage and transport functions. *Critical Reviews in Microbiology*, 48 (3), 283 – 302.

- Quintela, C., Peshkepia, E., Grimalt-Alemany, A., Nygård, Y., Olsson, L., Skiadas, I. V., & Gavala, H. N. (2024). Excessive ethanol oxidation versus efficient chain elongation processes. *Waste and Biomass Valorization*, 15 (4), 2545 – 2558.
- Rabaey, K., Boon, N., Siciliano, S. D., Verhaege, M., & Verstraete, W. (2004). Biofuel cells select for microbial consortia that self-mediate electron transfer. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (9), 5373 – 5382.
- Rabaey, K., Rodríguez, J., Blackall, L. L., Keller, J., Gross, P., Batstone, D., Verstraete, W., & Nealson, K. H. (2007). Microbial ecology meets electrochemistry: electricity-driven and driving communities. *The ISME Journal*, 1 (1), 9 – 18.
- Rago, L., Cristiani, P., Villa, F., Zecchin, S., Colombo, A., Cavalca, L., & Schievano, A. (2017). Influences of dissolved oxygen concentration on biocathodic microbial communities in microbial fuel cells. *Bioelectrochemistry*, 116, 39 – 51.
- Rahimnejad, M., Adhami, A., Darvari, S., Zirepour, A., & Oh, S.-E. (2015). Microbial fuel cell as new technology for bioelectricity generation: a review. *Alexandria Engineering Journal*, 54 (3), 745 – 756.
- Reardon, P. N., & Mueller, K. T. (2013). Structure of the type IVa major pilin from the electrically conductive bacterial nanowires of *Geobacter sulfurreducens*. *Journal of Biological Chemistry*, 288 (41), 29260 – 29266.
- Reguera, G., Nevin, K. P., Nicoll, J. S., Covalla, S. F., Woodard, T. L., & Lovley, D. R. (2006). Biofilm and nanowire production leads to increased current in *Geobacter sulfurreducens* fuel cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (11), 7345 – 7348.
- Reiner, J. E. (2019). Untersuchungen zur Nutzung von Knallgasbakterien als Biokatalysator in einem aeroben Elektrosyntheseprozess zur stofflichen Nutzung von CO<sub>2</sub>. Karlsruhe: Karlsruher Institut für Technologie (KIT).
- Ren, H., Lee, H.-S., Zhang, J., Gardner, C. L., & Chae, J. (2021). A quantitative extracellular electron transfer (EET) kinetics study of *Geobacter sulfurreducens* enriched microbial community reveals the transition of EET limiting step during biofilm growth. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46 (4), 3124 – 3134.
- Renslow, R. S., Babauta, J. T., Dohnalkova, A. C., Boyanov, M. I., Kemner, K. M., Majors, P. D., Fredrickson, J. K., & Beyenal, H. (2013). Metabolic spatial variability in electrode-respiring *Geobacter sulfurreducens* biofilms. *Energy & Environmental Science*, 6 (6), 1827.
- Romero, C. M., Martorell, P. V., López, A. G., Peñalver, C. G. N., Chaves, S., & Mechetti, M. (2018). Architecture and physicochemical characterization of *Bacillus* biofilm as a potential enzyme immobilization factory. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 162, 246 – 255.

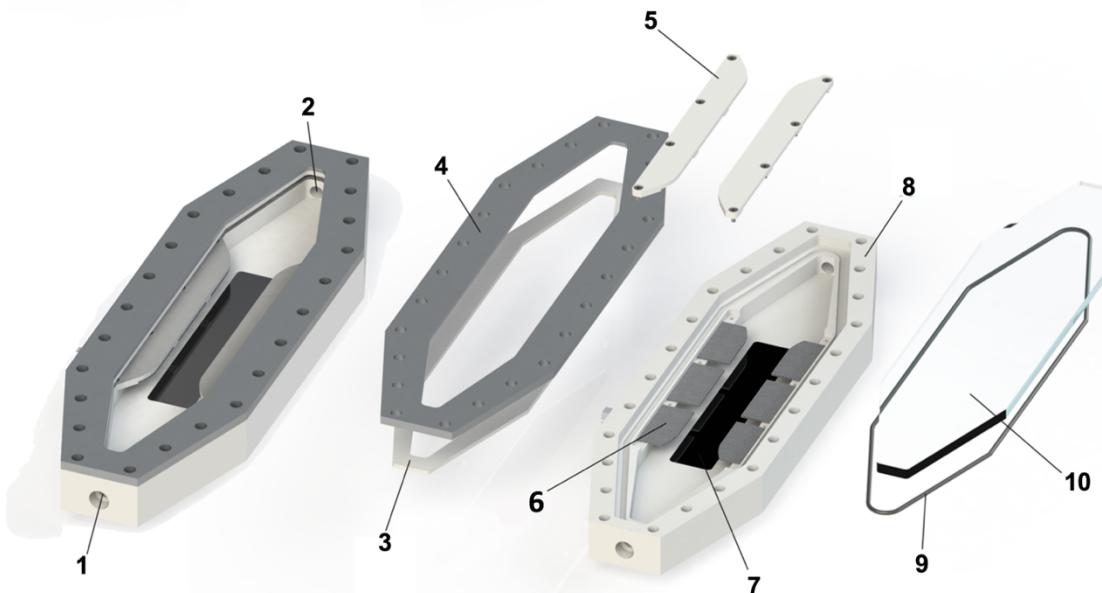
- Römling, U. (2023). Is biofilm formation intrinsic to the origin of life? *Environmental Microbiology*, 25 (1), 26 – 39.
- Rosenbaum, M. A., & Franks, A. E. (2014). Microbial catalysis in bioelectrochemical technologies: Status quo, challenges and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98 (2), 509 – 518.
- Rousseau, R., Etcheverry, L., Roubaud, E., Basséguy, R., Délia, M.-L., & Bergel, A. (2020). Microbial electrolysis cell (MEC): strengths, weaknesses and research needs from electrochemical engineering standpoint. *Applied Energy*, 257, 113938.
- Sapireddy, V., Katuri, K. P., Muhammad, A., & Saikaly, P. E. (2021). Competition of two highly specialized and efficient acetoclastic electroactive bacteria for acetate in biofilm anode of microbial electrolysis cell. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 7 (1), 47.
- Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D. M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P. S., & Bjarnsholt, T. (2022). The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology*, 20 (10), 608 – 620.
- Scarborough, M. J., Myers, K. S., Donohue, T. J., & Noguera, D. R. (2020). Medium-chain fatty acid synthesis by “*Candidatus Weimeria bifida*” gen. nov., sp. nov., and “*Candidatus Pseudoramibacter fermentans*” sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology*, 86 (3), e02242-19.
- Schmid, F., Novion Ducassou, J., Couté, Y., & Gescher, J. (2021). Developing *Rhodobacter sphaeroides* for cathodic biopolymer production. *Bioresource Technology*, 336, 125340.
- Schröder, U., Harnisch, F., & Angenent, L. T. (2015). Microbial electrochemistry and technology: terminology and classification. *Energy & Environmental Science*, 8 (2), 513 – 519.
- Seitz, H.-J., Schink, B., Pfennig, N., & Conrad, R. (1990). Energetics of syntrophic ethanol oxidation in defined chemostat cocultures: 2. Energy sharing in biomass production. *Archives of Microbiology*, 155 (1), 89 – 93.
- Slonczewski, J., & Foster, J. W. (2012). *Mikrobiologie: Eine Wissenschaft mit Zukunft* (J. Hilbig, B. Jarosch, L. Seidler, & O. Werner, Trans.; 2. Auflage). Springer Spektrum.
- Speers, A. M., & Reguera, G. (2012). Electron donors supporting growth and electroactivity of *Geobacter sulfurreducens* anode biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (2), 437 – 444.
- Spormann, A. M. (2023). *Principles of Microbial Metabolism and Metabolic Ecology*. Springer International Publishing.

- Sturm, G., Richter, K., Doetsch, A., Heide, H., Louro, R. O., & Gescher, J. (2015). A dynamic periplasmic electron transfer network enables respiratory flexibility beyond a thermodynamic regulatory regime. *The ISME Journal*, 9 (8), 1802 – 1811.
- Summers, Z. M., Fogarty, H. E., Leang, C., Franks, A. E., Malvankar, N. S., & Lovley, D. R. (2010). Direct exchange of electrons within aggregates of an evolved syntrophic coculture of anaerobic bacteria. *Science*, 330 (6009), 1413 – 1415.
- Sun, D., Chen, J., Huang, H., Liu, W., Ye, Y., & Cheng, S. (2016). The effect of biofilm thickness on electrochemical activity of *Geobacter sulfurreducens*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41 (37), 16523 – 16528.
- Tender, L. M., Reimers, C. E., Stecher, H. A., Holmes, D. E., Bond, D. R., Lowy, D. A., Pilobello, K., Fertig, S. J., & Lovley, D. R. (2002). Harnessing microbially generated power on the seafloor. *Nature Biotechnology*, 20 (8), 821 – 825.
- Thauer, R. K., Jungermann, K., & Decker, K. (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological Reviews*, 41 (1), 100 – 180.
- Thielges, S. (2023). Die globale Abkehr von fossiler Energie: Ein blinder Fleck der Klimaaußnenpolitik. (*SWP-Aktuell*, 31/2023). Berlin: Stiftung Wissenschaft und Politik - SWP - Deutsches Institut für Internationale Politik und Sicherheit.
- Tsachaki, M., Gady, A.-L., Kalopesas, M., Linforth, R. S. T., Athès, V., Marin, M., & Taylor, A. J. (2008). Effect of ethanol, temperature, and gas flow rate on volatile release from aqueous solutions under dynamic headspace dilution conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (13), 5308 – 5315.
- Ursua, A., Gandia, L. M., & Sanchis, P. (2012). Hydrogen production from water electrolysis: current status and future trends. *Proceedings of the IEEE*, 100 (2), 410 – 426.
- Usman, M., Zhao, S., Jeon, B.-H., Salama, E.-S., & Li, X. (2022). Microbial  $\beta$ -oxidation of synthetic long-chain fatty acids to improve lipid biomethanation. *Water Research*, 213, 118164.
- Vassilev, I., Dessì, P., Puig, S., & Kokko, M. (2022). Cathodic biofilms – A prerequisite for microbial electrosynthesis. *Bioresource Technology*, 348, 126788.
- Viulu, S., Nakamura, K., Kojima, A., Yoshiyasu, Y., Saitou, S., & Takamizawa, K. (2013). *Geobacter sulfurreducens* subsp. *ethanolicus*, subsp. nov., an ethanol-utilizing dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium from a lotus field. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 59 (5), 325 – 334.
- Von Stockar, U. (2010). Biothermodynamics of live cells: a tool for biotechnology and biochemical engineering. *Journal of Non-Equilibrium Thermodynamics*, 35 (4), 415 – 475.

- Wagner, M., & Horn, H. (2017). Optical coherence tomography in biofilm research: a comprehensive review. *Biotechnology and Bioengineering*, 114 (7), 1386 – 1402.
- Wagner, R. C., Call, D. F., & Logan, B. E. (2010). Optimal set anode potentials vary in bioelectrochemical systems. *Environmental Science & Technology*, 44 (16), 6036 – 6041.
- Wang, F., Gu, Y., O'Brien, J. P., Yi, S. M., Yalcin, S. E., Srikanth, V., Shen, C., Vu, D., Ing, N. L., Hochbaum, A. I., Egelman, E. H., & Malvankar, N. S. (2019). Structure of microbial nanowires reveals stacked hemes that transport electrons over micrometers. *Cell*, 177 (2), 361 – 369.
- Wang, H., & Ren, Z. J. (2013). A comprehensive review of microbial electrochemical systems as a platform technology. *Biotechnology Advances*, 31 (8), 1796 – 1807.
- Widdel, F., Kohring, G.-W., & Mayer, F. (1983). Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids: III. Characterization of the filamentous gliding *Desulfonema limicola* gen. nov. sp. nov., and *Desulfonema magnum* sp. nov. *Archives of Microbiology*, 134 (4), 286 – 294.
- Xie, L., Yoshida, N., Ishii, S., & Meng, L. (2021). Isolation and polyphasic characterization of *Desulfuromonas versatilis* sp. nov., an electrogenic bacteria capable of versatile metabolism isolated from a graphene oxide-reducing enrichment culture. *Microorganisms*, 9 (9), 1953.
- Xu, C., Wu, X., Shan, Z., Zhang, Q., Dang, B., Wang, Y., Wang, F., Jiang, X., Xue, Y., & Shi, C. (2024). Bi-level configuration and operation collaborative optimization of shared hydrogen energy storage system for a wind farm cluster. *Journal of Energy Storage*, 86, 111107.
- Yan, J., Fei, C., Mao, S., Moreau, A., Wingreen, N. S., Košmrlj, A., Stone, H. A., & Bassler, B. L. (2019). Mechanical instability and interfacial energy drive biofilm morphogenesis. *eLife*, 8, e43920.
- Zacharoff, L., Chan, C. H., & Bond, D. R. (2016). Reduction of low potential electron acceptors requires the CbcL inner membrane cytochrome of *Geobacter sulfurreducens*. *Bioelectrochemistry*, 107, 7 – 13.
- Zarabadi, M. P., Couture, M., Charette, S. J., & Greener, J. (2019). A generalized kinetic framework applied to whole-cell bioelectrocatalysis in bioflow reactors clarifies performance enhancements for *Geobacter sulfurreducens* biofilms. *ChemElectroChem*, 6 (10), 2715 – 2718.
- Zhang, Y., & Angelidaki, I. (2014). Microbial electrolysis cells turning to be versatile technology: recent advances and future challenges. *Water Research*, 56, 11 – 25.
- Zhu, X., Tao, Y., Liang, C., Li, X., Wei, N., Zhang, W., Zhou, Y., Yang, Y., & Bo, T. (2015). The synthesis of n-caproate from lactate: a new efficient process for medium-chain carboxylates production. *Scientific Reports*, 5 (1), 14360.

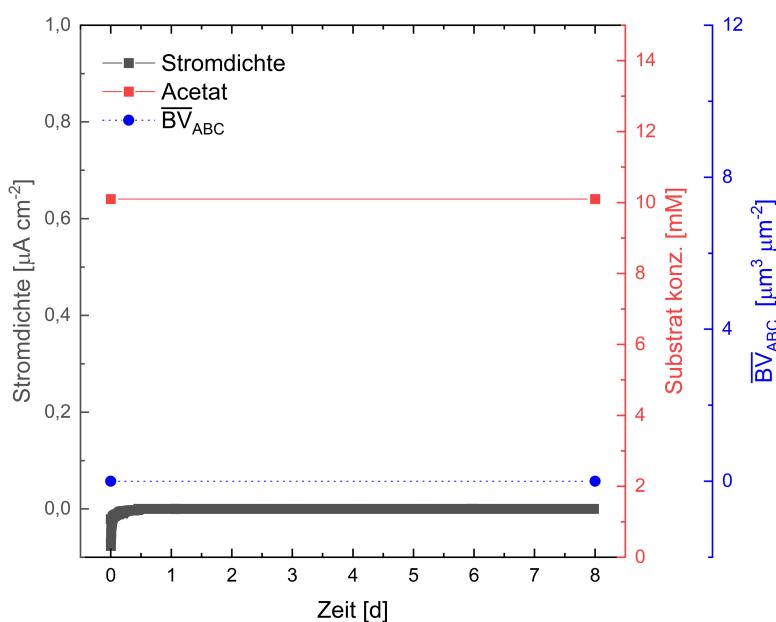
# Anhang

## Abbildungen im Anhang

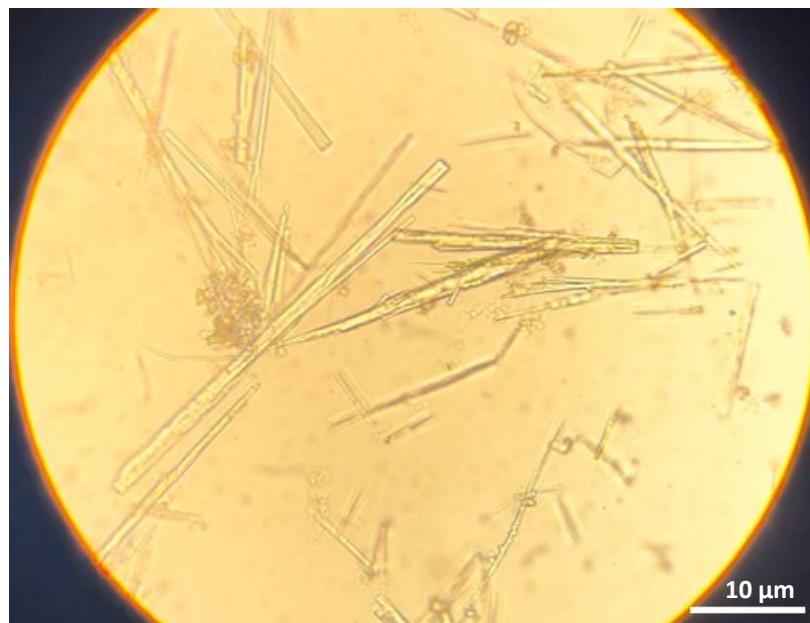


**Abb. S 1:** 3D-Rendering einer **assemblierten Fließzelle** (links) und zugehörige Explosionszeichnungen (rechts) (Reiner, 2019).

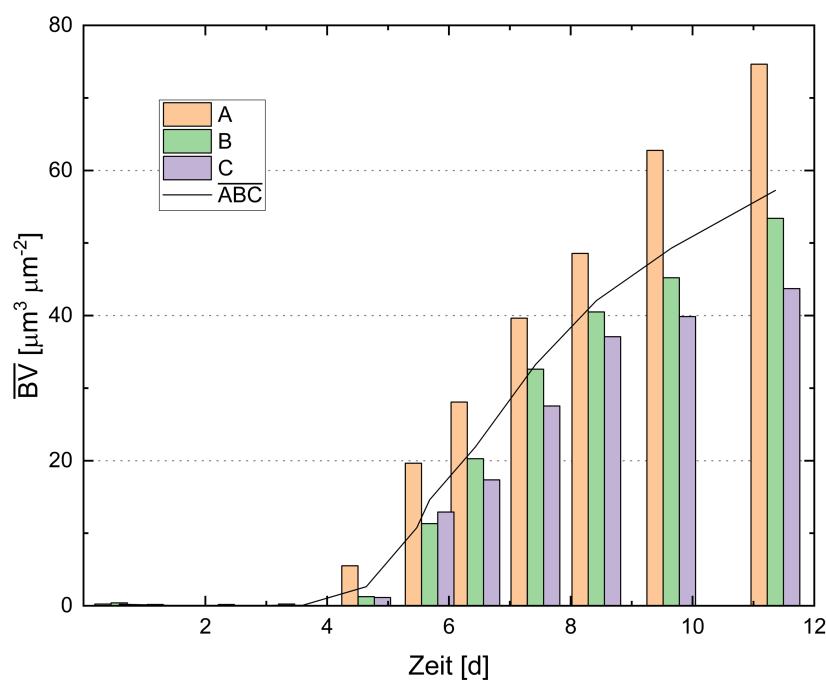
1 – Zufluss; 2 – Abfluss; 3 – Abstandshalter; 4 – Abdeckung; 5 – Kathodenhalterung; 6 – Kathodensegment; 7 – Anode; 8 – Gehäuse; 9 – O-Ring; 10 – Sichtfenster aus Polycarbonat.



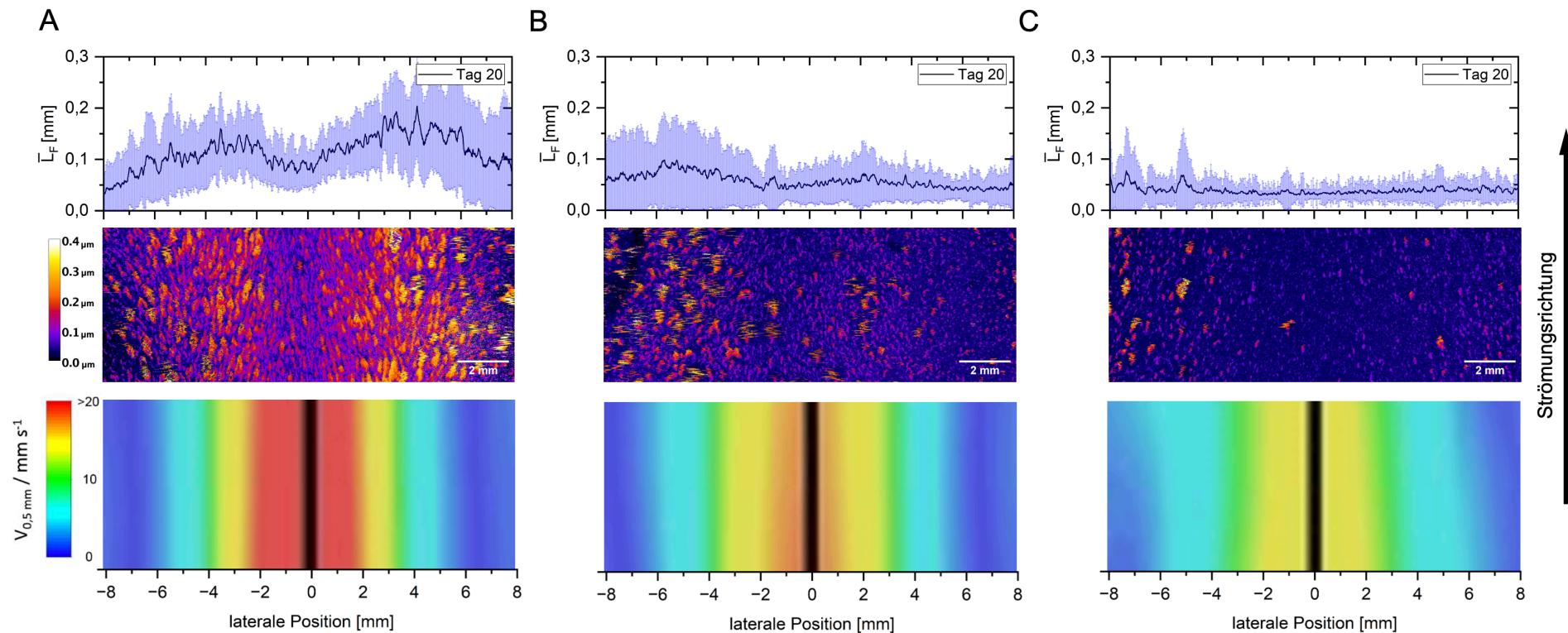
**Abb. S 2:** Darstellung der Negativkontrolle aller in dieser Arbeit präsentierten bioelektrochemischen Kultivierungen.



**Abb. S 3:** Lichtmikroskopische Aufnahme ausgefallener Salze im MEC-Medium nach erhöhen des pH-Wertes auf pH = 9,3. Es wurde eine 1000 x Vergrößerung gewählt, der Maßstabsbalken ist unten rechts abgebildet.

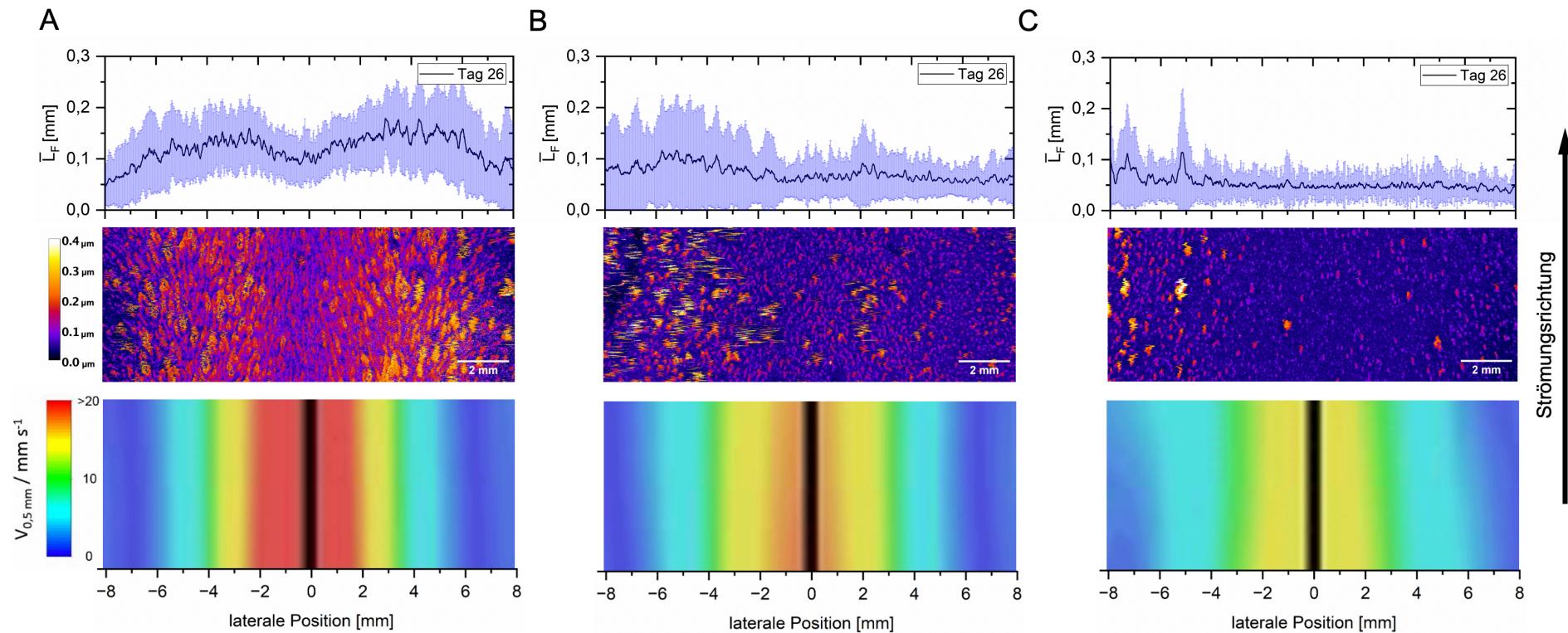


**Abb. S 4:** Vergleich des spezifischen Biofilmvolumens der *D. acetexigens* Des2A-Kultivierung an unterschiedlichen Positionen der Anode. Die dargestellten Biofilmvolumina wurden an den OCT-Aufnahmepositionen A, B und C (vgl. Abb. 21) (8 mm x 6 mm; B x L) generiert.



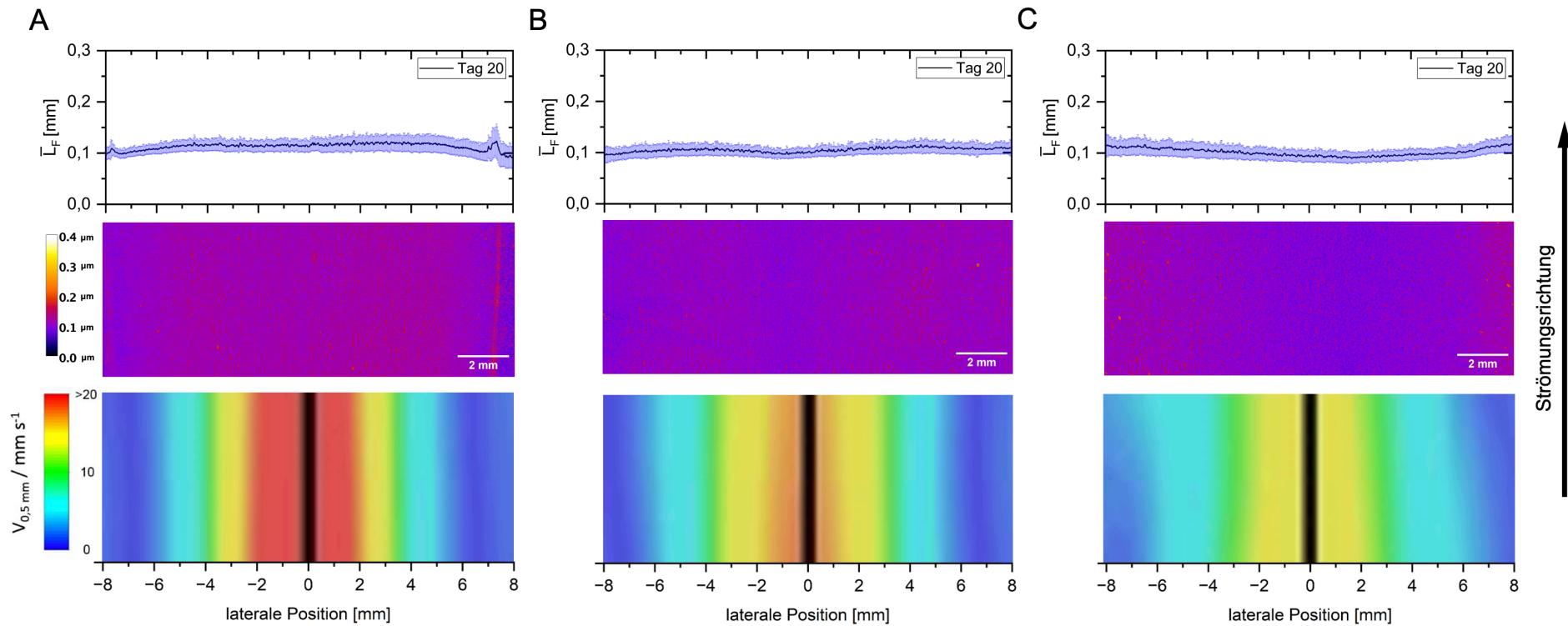
**Abb. S 5: Einfluss der Strömungsbedingungen auf das laterale Biofilmwachstumsverhalten von *G. sulfurreducens*.**

Darstellung des lateralen Biofilmwachstums (Geo1B, Kap. 4.2.3; 4.2.5), 20 Tage nach Repolarisierung der Anode an den OCT-Aufnahmepositionen A, B und C (vgl. Abb. 21). Ersichtlich ist die Profildarstellung (oben) des Höhenprofils (mittig) und die laminaren Strömungsbedingungen, ausgehend von der lateralen Position auf der Anode. Die Farbskalierung (mittig links) des Höhenprofils reicht von 0 – 400  $\mu\text{m}$ ; die Strömungsbedingungen erreichen bei einem Volumenstrom von  $100 \text{ mL min}^{-1}$  eine maximale Geschwindigkeit von  $23 \text{ mm s}^{-1}$ . Die Geschwindigkeitsskalierung ist unten links dargestellt, die Strömungsrichtung ist rechts gekennzeichnet.



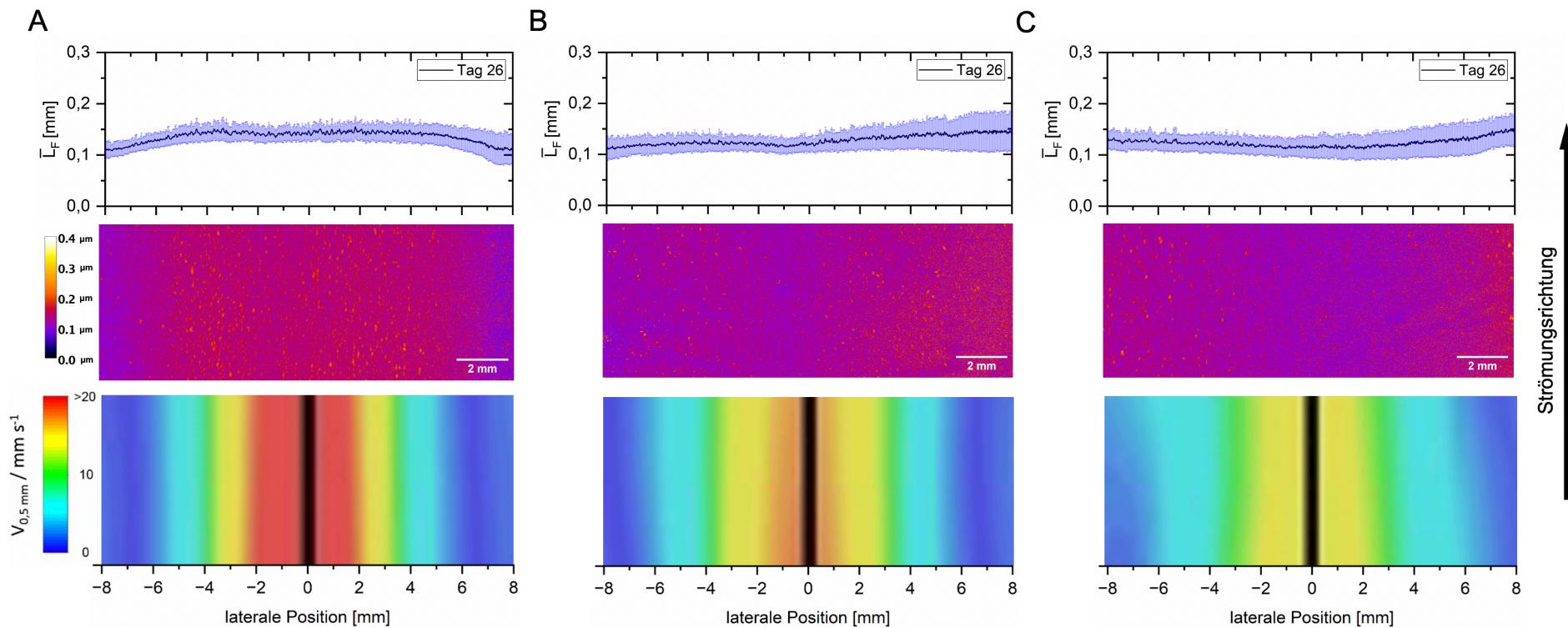
**Abb. S 6: Einfluss der Strömungsbedingungen auf das laterale Biofilmwachstumsverhalten von *G. sulfurreducens*.**

Darstellung des lateralen Biofilmwachstums (Geo1B, Kap. 4.2.3; 4.2.5), 26 Tage nach Repolarisierung der Anode an den OCT-Aufnahmepositionen A, B und C (vgl. Abb. 21). Ersichtlich ist die Profildarstellung (oben) des Höhenprofils (mittig) und die laminaren Strömungsbedingungen, ausgehend von der lateralen Position auf der Anode. Die Farbskalierung (mittig links) des Höhenprofils reicht von 0 – 400  $\mu\text{m}$ ; die Strömungsbedingungen erreichen bei einem Volumenstrom von 100  $\text{mL min}^{-1}$  eine maximale Geschwindigkeit von 23  $\text{mm s}^{-1}$ . Die Geschwindigkeitsskalierung ist unten links dargestellt, die Strömungsrichtung ist rechts gekennzeichnet.



**Abb. S 7: Einfluss der Strömungsbedingungen auf das laterale Biofilmwachstumsverhalten von *D. acetexigens*.**

Darstellung des lateralen Biofilmwachstums (Des3B, Kap. 4.2.2; 4.2.5), 20 Tage nach Repolarisierung der Anode an den OCT-Aufnahmepositionen A, B und C (vgl. Abb. 21). Ersichtlich ist die Profildarstellung (oben) des Höhenprofils (mittig) und die laminaren Strömungsbedingungen, ausgehend von der lateralen Position auf der Anode. Die Farbskalierung (mittig links) des Höhenprofils reicht von 0 – 400  $\mu\text{m}$ ; die Strömungsbedingungen erreichen bei einem Volumenstrom von  $100 \text{ mL min}^{-1}$  eine maximale Geschwindigkeit von  $23 \text{ mm s}^{-1}$ . Die Geschwindigkeitsskalierung ist unten links dargestellt, die Strömungsrichtung ist rechts gekennzeichnet.



**Abb. S 8: Einfluss der Strömungsbedingungen auf das laterale Biofilmwachstumsverhalten von *D. acetexigens*.**

Darstellung des lateralen Biofilmwachstums (Des3B, Kap. 4.2.2; 4.2.5), 26 Tage nach Repolarisierung der Anode an den OCT-Aufnahmepositionen A, B und C (vgl. Abb. 21). Ersichtlich ist die Profildarstellung (oben) des Höhenprofils (mittig) und die laminaren Strömungsbedingungen, ausgehend von der lateralen Position auf der Anode. Die Farbskalierung (mittig links) des Höhenprofils reicht von 0 – 400  $\mu\text{m}$ ; die Strömungsbedingungen erreichen bei einem Volumenstrom von 100  $\text{mL min}^{-1}$  eine maximale Geschwindigkeit von  $23 \text{ mm s}^{-1}$ . Die Geschwindigkeitsskalierung ist unten links dargestellt, die Strömungsrichtung ist rechts gekennzeichnet.

## Tabellen im Anhang

### MM148

Nach in Lösung Bringen aller Inhaltsstoffe (außer Karbonat, Vitaminen und Sulfid) in  $\text{ddH}_2\text{O}$  und pH-Adjustierung auf 7,4 wurde das MM-184 der DSMZ (Tab. S1 – S4) 30 - 45 Minuten lang mit 100 % N<sub>2</sub> anaerobisiert. Nach Autoklavieren des Mediums wird es durch Zugabe der separat sterilisierten anoxischen Stammlösungen (100-% N<sub>2</sub>-Gasatmosphäre) von Vitaminen und Sulfid, sowie von Karbonat aus einer sterilen anoxischen Stammlösung, die unter einer Gasatmosphäre von 80% N<sub>2</sub> und 20% CO<sub>2</sub> anaerobisiert wurde, komplementiert. Die Vitamine werden durch Filtration sterilisiert. Der pH-Wert des gesamten Mediums wird auf 7,0-7,2 eingestellt.

**Tab. S 1:** Zusammensetzung des Minimalmediums 148 der DSMZ.

Substanz	Konzentration
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g/L
NH <sub>4</sub> Cl	0,5 g/L
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,4 g/L
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,1 g/L
M320-SL-10 Spurenelementlösung (1000x)	1 mL/L
M358-Selenit-Wolframat Lösung (1000x)	1 mL/L
Na-Aacetat	0,5 g/L
Fumarsäure	1,5 g/L
Na-Resazurin (0,1 w/v)	0,5 mL/L
<i>ad 995 mL ddH<sub>2</sub>O, pH auf 7,4 einstellen, mit 100 % N<sub>2</sub> anaerobisieren, autoklavieren. Zugabe von:</i>	
M503 Sieben-Vitaminlösung (1000 x)	1 mL/L
NaS x 9 H <sub>2</sub> O	0,5 g/L
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,5 g/L

**Tab. S 2:** Zusammensetzung der SL-10 Spurenelementlösung (*Widdel et al.*, 1983) (1000 x) des Minimalmediums MM320 der DSMZ.

Substanz	Konzentration
HCL (25 %)	10 mL
FeCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	1,5 g/L
Zuerst FeCl <sub>2</sub> in HCL auflösen, dann in Wasser verdünnen und die anderen Salze auflösen- Final auf 1000 mL auffüllen und kühl und lichtgeschützt lagern	
ZnCl	70 mg/L
MnCl x 4 H <sub>2</sub> O	100 mg/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6 mg/L
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	190 mg/L
CuCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	2 mg/L
NiCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	24 mg/L
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	36 mg/L

**Tab. S 3:** Zusammensetzung der Selenit-Wolframatlösung nach dem Minimalmedium 385 der DSMZ.

Substanz	Konzentration
NaOH	0,5 g
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	3 mg/L
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	4 mg/L

**Tab. S 4:** Zusammensetzung der Sieben-Vitaminlösung (1000x) nach dem Minimalmedium 503 der DSMZ.

Substanz	Konzentration
Vitamin B <sub>12</sub>	100 mg/L
P-Aminobenzoësäure	80 mg/L
Biotin	20 mg/L
Nicotinsäure	200 mg/L
DL-Ca-Pantothenat	100 mg/L
Pyridoxin-HCl	300 mg/L
Thiamin-HCl x 2 H <sub>2</sub> O	200 mg/L

**Tab. S 5:** Ethanolkonzentrationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Duplikat-Kultivierungen Des2AB, Des3AB und Geo1AB nach Repolarisierung der Arbeitselektrode zur Anode.

Experiment	Zeitpunkt (Tage)	Ethanol (mM)
Des2A	10	6,5
Des2B	6	12,5
Des3A	8	2,1
Des3B	26	1,6
Geo1A	9	2,5
Geo1B	14	28
	26	0

# Genutzte Makros

## Hauptprogramm

```

// Before starting macro the following steps must be checked
// 1-Image must be extracted vom *.oct file; *.tif file must be saved in a separate folder (dir)
// 2-Separate folders for "untilt", "voxel_count", "height_map", "rough_poro" and "crossection" must
be created
// 3-Check directories of macros in lines 31, 53, 63, 86 --> if neccesary update directories
// 4-Check size of rectangle in line 23 and 37 --> if neccesary update
// 5-Check and adjust threshold and offset in untilt macro (line 31)

function alle_Bilder(input, output, filename)
{
open(input + filename);
img = getTitle();
selectWindow(img);
//print(img);
img_short = substring(img, 0, lengthOf(img)-4);
//print(img_short);
dir = getDirectory("image");
//print(dir);
//Pre-Processing
// Convert Macros
run("8-bit");
makeRectangle(0, 215, 1000, 320); // fuer 1,5 mm hohes Bild viel BF
run("Crop");
//run("Median...", "radius=2 stack");
run("Enhance Contrast", "saturated=0.5");
run("Apply LUT", "stack");
runMacro("X:/Masterarbeit/Macros_Max/OCT_untilt.ijm");
//run("Select All");
//saveAs("tiff", output + img_short + "_untilt"); // if untilt image should be saved
//run("Close All");
//Image Segmentation
makeRectangle(0, 185, 1000, 135);
run("Crop");
//run("Brightness/Contrast...");
//run("Enhance Contrast", "saturated=0.35"); // wenn nicht am Anfang
//run("Apply LUT", "stack");
setAutoThreshold("Otsu");

```

```
setThreshold(0, 97);
setOption("BlackBackground", false);
run("Convert to Mask", "method=Otsu background=Light");
run("Remove Outliers...", "radius=2 threshold=50 which=Bright stack"); //
saveAs("tiff", output + img_short + "_binary");
//Post-Processing and Analysis
//Voxel Count Macro
runMacro("X:/Masterarbeit/Macros_Max/Voxel_Counter.ijm");
 getInfo("log");
selectWindow("Log");
saveAs("Text", output + img_short + "_Voxel_Count");
close("Log");
selectWindow("Results");
close("Results");
//Height Map + Surface Coverage
run("Invert", "stack");
runMacro("X:/Masterarbeit/Macros_Max/HM_SC_neu.ijm");
selectWindow("Log");
saveAs("txt", output + img_short + "_HeightMap");
close("Log");
run("Select All");
run("Duplicate...", "duplicate");
saveAs("tiff", output + img_short + "_HeightMap");
saveAs("jpeg", output + img_short + "_HeightMap");
close("Log");
run("Close");
run("Close");
run("Close");
//run("Close All");
//create sideview
setSlice(nSlices/2);
saveAs("jpeg", output + img_short + "_sideview");
setSlice(1);
//run("Close All");
//Roughness + Porosity
run("Invert", "stack");
runMacro("X:/Masterarbeit/Macros_Max/Rough_Poro.ijm");
selectWindow("Results");
```

```
saveAs("Results", output + img_short + "_Rough + Poro.csv");
close("Results");
close("Log");
run("Close All");
}
input = getDirectory("Select directory...");
//print(input);
output = getDirectory("Select directory... ");
//print(output);
//setBatchMode(true);
list = getFileList(input);
for (i=0; i<list.length; i++){
    print(list[i]);
    alle_Bilder(input, output, list[i]);
}
//setBatchMode(false);
```

**OCT\_untilt**

```

// first macro to run

// manual steps: conversion to 8-bit, thres readout

// set threshold on 8-bit dataset (0-255)

//thres = 200;

//für Sulfolobus von oben

//200

//thres = 190; //FZ1P1

//thres = 200; //FZ1P3, FZ1P5

thres = 175; //wenn Kontrast hoch vor untilt

y_offset = 9; //8 genau über Kathode // für Bedeckung 10

img = getTitle();

img_short = substring(img, 0, lengthOf(img)-4);

dir = getDirectory("image");

//


//if (bitDepth() != 8) {

//    run("8-bit", "stack");

//}

//if (false) {

//    run("Median...", "radius=1 stack");

//}

//


getLocationAndSize(x_coord, y_coord, width, height);

//


getVoxelSize(Vwidth, Vheight, Vdepth, Vunit);

//


w = getWidth();

h = getHeight();

//


counter = 0;

coordX = newArray(w);

coordY = newArray(w);

//


newImage(img_short + "_untilt", "8-bit Black", w, h, nSlices);

```

```
setLocation(x_coord + width + 10, y_coord);
//  
setBatchMode(true);
//  
for (s=1;s<=nSlices;s++) {  
    //if (s==2) {  
        //getBoolean("Press OK to proceed...");  
    //}  
    selectWindow(img);  
    setSlice(s);  
    //  
    for (x=0;x<w;x++) {  
        selectWindow(img);  
        makeLine(x,h,x,0);  
        P = getProfile();  
        stop = 0;  
        ii = 0;  
        for (i=0;i<lengthOf(P);i++) {  
            //  
            if ((P[i] >= thres) & (stop == 0)) {  
                ii = i;  
                stop = 1;  
            }  
        }  
        // output  
        selectWindow(img_short + "_untilt");  
        setSlice(s);  
        for (n=ii;n<lengthOf(P);n++) {  
            setPixel(x,n - ii - y_offset,P[n]);  
        }  
    }  
    //  
    run("Select None");
```

```
setVoxelSize(Vwidth, Vheight, Vdepth, Vunit);
run("Flip Vertically", "stack");
//
selectWindow(img);
run("Select None");
//
setBatchMode(false);
//
if (nSlices == 1) {
    run("Copy");
}
//
if (false) {
    selectWindow(img);
    close();
}
//showMessage("Done.");
```

**Voxel\_Counter**

```
// ImageJ Macro Code

// Measure Volume of Thresholded Pixels in an Image Stack

//



macro "Measure Stack" {

    run("Clear Results"); // First, clear the results table

    run("Invert", "stack");

    for (n=1; n<=nSlices; n++) {

        setSlice(n);

        run("Measure");

    }

    totalArea = 0;

    for (n=0; n < nResults; n++) {

        totalArea += getResult("Mean",n)*getResult("Area",n)/getResult("Max",n);

    }

    getVoxelSize(width, height, depth, unit);

    //refractive_index =1.333;

    //volume = totalArea*depth/refractive_index;

    volume = totalArea*depth;

    // Store the volume in a variable named "resultVolume"

    //setResult("Volume", volume);

    // Optionally, print the result to the log

    print("Volume = " + volume + " " + unit + "^3");

    //print("Width = " + width + " " + unit);

    //print("Height = " + height + " " + unit);

    //print("Depth = " + depth + " " + unit);

    //print("Refractive index = " + refractive_index);

    run("Invert", "stack");

}

}
```

**HM\_SC\_neu**

```

// requires a resliced (xy-planes) binary stack
// stack needs also be reduced the the biofilm
// important: check if stack is scaled (x, y, z)
// last modified: 16.02.2018

// getVoxelSize(width, height, depth, unit)
// Einheit der Ausgaben auf mm geändert
//function alle_Bilder_HP (input, output, filename)
//{
//open(input + filename);
//filename2 = File.nameWithoutExtension;
//run("Invert", "stack"); //wird bereits im Hauptprogramm gemacht
run("Grays");

getVoxelSize(dx, slice_thickness, dy, unit);
//getVoxelSize(dx, dy, slice_thickness, unit);
//
firstSlice = 1;
img = getTitle();
dir = getDirectory("image");
//
run("Duplicate...", "title=" + img + "_dup duplicate range=" + firstSlice + "-" + nSlices);
run("32-bit");
//run("Remove Outliers...", "radius=1 threshold=1 which=Bright stack");
// reslice to xyz
run("Reslice [/]...", "output=" + dy + " start=Top avoid");
//
for (i=1;i<=nSlices;i++) {
    setSlice(i);
    run("Divide...", "value=255");
    DepthCode = (nSlices*slice_thickness) - ((i-1)*slice_thickness);
    run("Multiply...", "value=" + DepthCode);
}
// make projection

```

```

run("Z Project...", "start=1 stop=" + nSlices + " projection=[Max Intensity]");
run("Fire");
//für Laengenskala von breitbildern die alle aufm Kopp stehen..
run("Rotate 90 Degrees Left");
run("Rotate 90 Degrees Left");
run("Scale Bar...", "width=2 height=5 thickness=10 font=55 color=White bold overlay");
setMinAndMax(0, 0.3);

//  

getRawStatistics(nPixels, mean, min, max, std, histogram);
print("image file: " + img);
print("directory: " + dir);
print("");
print("statistics:");
print("-----");
print("slice_thickness = " + slice_thickness + " mm");
print("min_thickness = " + min + " mm");
print("mean_thickness = " + mean + " mm");
print("max_thickness = " + max + " mm");
print("standard_deviation_of_thickness = " + std + " mm");
print("");

//surface coverage
getHistogram(values, counts, 256);
surface_coverage_1px = (1-(counts[0]+counts[1])/nPixels)*100;
surface_coverage_3px = (1-(counts[0]+counts[1]+counts[2]+counts[3])/nPixels)*100;
surface_coverage_5px = (1-
(counts[0]+counts[1]+counts[2]+counts[3]+counts[4]+counts[5])/nPixels)*100;
surface_coverage_10px = (1-
(counts[0]+counts[1]+counts[2]+counts[3]+counts[4]+counts[5]+counts[6]+counts[7]+counts[8]+cou
nts[9]+counts[10])/nPixels)*100;

print("surface_coverage_1px =" + surface_coverage_1px + "%");
print("surface_coverage_3px =" + surface_coverage_3px + "%");
print("surface_coverage_5px =" + surface_coverage_5px + "%");
print("surface_coverage_10px =" + surface_coverage_10px + "%");

```

```
//print("Histogram");  
// for (i=0; i<values.length; i++)  
//   print(values[i], counts[i]);  
  
//}  
//input = getDirectory("Select directory...");  
//output = getDirectory("Select directory...");  
// run function  
  
//setBatchMode(true);  
//list = getFileList(input);  
//for (i = 0; i < list.length; i++)  
//alle_Bilder_HP (input, output, list[i]);  
//setBatchMode(false);// first macro to run
```

**Rough\_Poro**

```
//Porosity Macro
//function action(input, output, filename) {
//    open(input + filename);
    img = getTitle();
    dir = getDirectory("image");
    run("Invert", "stack");
    run("8-bit");
    threshold=0;
    histo_stack=newArray(3);
    Stack.getDimensions(width, height, channels, slices, frames);
    for(k=1; k<=slices; k++) {
        Stack.setSlice(k);
        for(i=0;i<=width;i++) {
            b=0;
            biofilm_down = 0;
            makeLine(i,0,i,height);
            getStatistics(area, mean, min, max, std, histogram);
            if(max>0){
                for(j=0;j<height;j++){
                    if(b==0){
                        a=getPixel(i,j);
                        if(a>threshold){ //find first pixel with value >
threshold to find edges of the biofilm
                        b=1;
                        //areapx +=1;
                        //pix +=1;
                        setPixel(i,j,150);
                    }
                    else{
                        b=0;
                        setPixel(i,j,0);
                    }
                }
            }
        }
    }
}
```

```

a=getPixel(i,j);
if(a>threshold){//if(a>threshold){
    //areapx +=1;
    //pix+=1;
    setPixel(i,j,150);
}
else {
    //areaemp +=1;
    //pixemp +=1;
    setPixel(i,j,50);
}
}

}

}

else {
    b=0;
}
}

}

run("Select None");

Stack.getDimensions(width, height, channels, slices, frames);

for (s=1;s<=slices;s++) {
    setSlice(s);
    getHistogram(values, counts, 256);
    histo_stack[0] += counts[50];
    histo_stack[1] += counts[150];
}
porosity2=(histo_stack[0])/(histo_stack[1]+ histo_stack[0] );
//print(porosity2);
//saveAs("Text", "D:/Dateien_D/OCT/V21_5mg/fc13-16/" +
"Porosity");
//close();
//saveAs("Tiff", output + filename);

//setBatchMode(true);
//list = getFileList(input);

```

```

//for (i = 0; i < list.length; i++)
    //action(input, output, list[i]);

//setBatchMode(false);

//function action(input, output, filename) {
    //open(input + filename);
    //img = getTitle();
    //dir = getDirectory("image");

    threshold=50;
    run("Duplicate...", "title=new duplicate range=1-" + nSlices + "");
    Stack.getDimensions(width, height, channels, slices, frames);

    areafull = 0;
    gespx = 0;
    gesemp = 0;

    for(k=1; k<slices+1; k++) {
        Stack.setSlice(k);
        Lfsum = 0; //reset variables
        areapx = 0;
        areaemp = 0;
        areages = 0;
        Rasum = 0;
        Lfarray = newArray(width);

        for(i=0;i<width;i++) {
            b=0; //initial condition, if b=1 all pixel below is defined as biofilm
            for(j=0;j<height;j++){
                if(b==0){
                    a=getPixel(i,j);
                    if(a>threshold){ //find first pixel with value > thresold
                        to find edges of the biofilm
                        b=1;
                        areapx +=1;
                        setPixel(i,j,150);
                        Lfsum += (height-j);
                        Lfarray[i] = (height-j);
                    }
                    else{
                
```

```

b=0;
setPixel(i,j,0);
}

}

else {
    a=getPixel(i,j);
    if(a>50){//if(a>threshold){
        areapx +=1;
        setPixel(i,j,150);
    }
    else {
        areaemp +=1;
        setPixel(i,j,50);
    }
}

}

areages=areapx+areaemp; // additional "empty pixel need to be
substracted from the total area

Lf=Lfsum/width;
areafull +=areages;
gespx +=areapx;
gesemp +=areaemp; // substraction from the empty area
//saveAs("Tiff", output + filename);

//Calculation of surface roughness coefficient
for(l=0;l<(Lfarray.length);l++) { //calculation starts here!!!
    Rasum += abs(Lfarray[l]-Lf);
}

Ra=Rasum/(width-1);
Rastar=Rasum/(Lf*width); //SURFACE roughness coefficient
porosity = 100*gesemp/areafull;
additionalpixel=0; // to make sure the variable is empty
setResult("Slice", k-1, k);
setResult("L_f", k-1, Lf);

```

```
setResult("area empty", k-1,areaemp);
setResult("area full", k-1, areages);
setResult("Porosity", k-1, porosity);
setResult("Ra", k-1, Ra);
setResult("Ra_star", k-1, Rastar);
//run("Summarize");
//saveAs("Text", "D:/Dateien_D/OCT/V21_5mg/fc9-12/" + "Roughness");
//close();
//run("Close");
}
run("Summarize");
print("result")
setBatchMode(false);
print("image file: " + img);
print("directory: " + dir);
//print("");
print("porosity2: " + porosity2);
print("Porosity: " + porosity);
print("Lf: " + Lf);
print("Ra: " + Ra);
print("Ra_star: " + Rastar);
run("Summarize");
print("");
//print("-----")
close();
//saveAs("Text", "D:/Dateien_D/OCT/V21_5mg/fc1_8/" + "Roughness2");
//}
//}
//run("Summarize");
//save log
//save image
//save results
```

```
// "PlotProfileWithSD"  
// This macro is a customized version of the Plot Profile  
// command that calculates the standard deviation of each  
// Y intensity column and displays it as an error bar. The  
// mean intensities and standard deviations are also  
// displayed in the "Results" table. The size of the error  
// bars is determined by the 'errorBarScale' variable.  
  
errorBarScale = 1;  
if (selectionType!=0)  
    exit("Rectangular selection required");  
getSelectionBounds(xbase, ybase, width, height);  
profile = newArray(width);  
sd = newArray(width);  
n = height;  
for (x=xbase; x<xbase+width; x++) {  
    makeRectangle(x, ybase, 1, height);  
    getStatistics(area, mean, min, max, std);  
    profile[x-xbase] = mean;  
    sd[x-xbase] = std;  
}  
makeRectangle(xbase, ybase, width, height);  
run("Clear Results");  
for (i=0; i<width; i++) {  
    setResult("Mean", i, profile[i]);  
    setResult("SD", i, sd[i]);  
    sd[i] *= errorBarScale;  
}  
updateResults;  
Plot.create("Profile Plot", "X", "Value", profile);  
Plot.add("error bars", sd);
```

## Danksagung

In erster Linie möchte ich Prof. Harald Horn und Frau Dr. Abbt-Braun danken, die es mir ermöglicht haben, nicht nur meine Masterarbeit an ihrem Institut zu schreiben, sondern vorher über ein Jahr am EBI zu arbeiten und in unterschiedlichste Themen einzutauchen.

Ein großes Dankeschön geht auch an meine Betreuerin Dr. Andrea Hille-Reichel. Vielen Dank für deine nie ausbleibende Hilfsbereitschaft, deinen Ideenreichtum und dein Engagement, immer mit im Labor zu stehen und Probleme zu erörtern.

Trotz aller oben schon ausgesprochener Dankeschöns geht mein größter Dank an euch, Max und Johannes! Ihr beide habt mir gezeigt, wie es ist, Forscher zu sein. Wie es ist, erstmal zu verstehen, was man eigentlich vorhat, bevor man drangeht. Und manchmal auch das Gleiche andersrum.

Auch für die Idee dieser Arbeit, Max, bin ich dir super dankbar. Du bist einfach ein Held!

Auch möchte ich meiner Freundin Manon danken, die während der kompletten Arbeit immer als Rückgrat hinter mir stand.

Zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die mir das Ganze erst ermöglicht hat und mich in allen Situationen unfassbar unterstützt hat.