

Entwicklung eines Prozesses zur oxischen
mikrobiellen Elektrosynthese mit
Kyrpidia spormannii unter besonderer
Berücksichtigung der Prozesseffizienz

Vom Promotionsausschuss der
Technischen Universität Hamburg
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor-Ingenieurin (Dr.-Ing.)

genehmigte Dissertation (Monografie)

von
Leonie Rominger

aus
Heidenheim an der Brenz

2025

ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0007-8922-8296>

DOI: <https://doi.org/10.15480/882.16022>

Datum der mündlichen Prüfung: 07.10.2025

Erstgutachter: Prof. Dr. Johannes Gescher

Zweitgutachter: Prof. Dr. Ralf Pörtner

Vorsitz des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Felix Löffler

Abstract

With the help of microbial electrosynthesis (MES), carbon dioxide from industrial point sources can be converted into chemical energy storages under biocatalysis, using electricity generated from renewable sources. Anoxic MES processes are already being used in industry, for example for the production of acetic acid or methane. However, the biomass yields are low and the range of products is limited. In contrast, oxic microbial electrosynthesis (oMES) enables the production of more valuable products and biomass. However, biofilm-based oMES processes have so far been insufficiently characterised, particularly with regard to their energy efficiency. There is a lack of studies analysing efficiency across different stages of biofilm growth. The influence of oxygen concentration on microbial growth, but also on the efficiency of the process, is not yet sufficiently understood. In addition, there is a lack of methods for continuous biofilm harvesting and investigations into the use of industrial flue gas as a substrate.

In this work, the oMES was operated with the Knallgas-bacterium *Kyrpidia spormannii*. The bioelectrochemical system used allowed non-invasive quantification of the biofilm using optical coherence tomography (OCT). This allowed to record growth kinetics, which determined the potential for the fastest biofilm growth at -375 mV to -500 mV vs SHE. Furthermore, the Coulombic efficiency could be determined over the process duration. It was 100 % in the most efficient phase. At this point, no system-side electron losses occurred, meaning that oMES cultivation achieved the same efficiency as Knallgas fermentation, but without the disadvantage of handling explosive gas mixtures. By modelling biofilm growth, the oxygen demand for the current growth phase of the biofilm could be predicted, and electron losses resulting from oxygen reduction could be reduced. With 35,8 kWh for the production of 1 kg dry biomass, the energy requirement of the oMES process was also competitive with a two-stage Knallgas fermentation. A method was developed to harvest the biofilm via hydrogen bubbles. The biofilm was able to regenerate after being partially harvested. The harvested biomass had a protein content of around 62 %. By adding a synthetic polymer, the initial growth phase of the biofilm until complete electrode coverage could be shortened. Finally, it was shown that the use of industrial flue gas as a substrate did not inhibit growth.

Zusammenfassung

Mithilfe der mikrobiellen Elektrosynthese (MES) kann Kohlenstoffdioxid aus industriellen Punktquellen mit regenerativ erzeugtem Strom biologisch katalysiert in chemische Energieträger umgewandelt werden. Anoxische MES-Prozesse finden bereits industrielle Anwendung, etwa zur Produktion von Essigsäure oder Methan. Jedoch sind die Biomasseausbeuten gering und das Produktspektrum ist begrenzt. Im Gegensatz dazu ermöglicht die oxische mikrobielle Elektrosynthese (oMES) die Herstellung hochwertiger Produkte sowie Biomasse. Biofilm-basierte oMES-Prozesse sind bislang jedoch unzureichend charakterisiert, insbesondere hinsichtlich ihrer Energieeffizienz. Es fehlen Studien, die die Effizienz über verschiedene Stadien des Biofilmwachstums analysieren. Der Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf das mikrobielle Wachstum, aber auch auf die Effizienz des Prozesses, wurde bisher nicht hinreichend verstanden. Zudem mangelt es an Methoden zur kontinuierlichen Biofilm-Ernte und Untersuchungen zum Einsatz industriellen Rauchgases als Substrat.

In dieser Arbeit wurde die oMES mit dem Knallgasbakterium *Kyrrpidia spormannii* betrieben. Das verwendete bioelektrochemische System erlaubte eine nicht-invasive Quantifizierung des Biofilms mittels optischer Kohärenztomographie (OCT). So konnten Wachstumskinetiken aufgenommen werden, die das Potential für das schnellste Biofilmwachstum bei -375 mV bis -500 mV vs. SHE bestimmten. Des Weiteren konnte die Coulomb'sche Effizienz über die Prozessdauer bestimmt werden. In der effizientesten Phase lag diese bei 100 %. An diesem Punkt traten keine systemseitigen Elektronenverluste auf, wodurch die oMES-Kultivierung dieselbe Effizienz wie eine Knallgasfermentation erreichte, jedoch ohne den Nachteil einer explosionsfähigen Gas Mischung. Mithilfe einer Modellierung des Biofilmwachstums konnten der Sauerstoffbedarf für die aktuelle Wachstumsphase des Biofilms vorhergesagt und Elektronenverluste durch Sauerstoffreduktion verringert werden. Der Energiebedarf des oMES-Prozesses war mit $35,8\text{ kWh}$ für die Produktion von 1 kg Biotrockenmasse ebenfalls konkurrenzfähig zu einer zweistufigen Knallgasfermentation. Es wurde eine Methode zur Ernte des Biofilms über Wasserstoffblasen entwickelt. Der Biofilm konnte sich nach der partiellen Ernte wieder regenerieren. Die geerntete Biomasse hatte einen Proteingehalt von knapp 62 %. Durch Zugabe eines synthetischen Polymers konnte die initiale Wachstumsphase des Biofilms bis zur vollständigen Elektrodenbedeckung verkürzt werden. Zuletzt wurde gezeigt, dass die Verwendung von industriellem Rauchgas als Substrat keine Inhibierung des Wachstums bewirkte.

Danksagung

Lieber Johannes, mein erster Dank geht an dich. Bis heute betrachte ich es als den glücklichsten Zufall meines Lebens, dass ich damals, 2019, das Video über das Projekt Bioelektroplast gesehen habe. So bin ich nämlich auf dich und deine Arbeitsgruppe aufmerksam geworden, habe mich auf eine Masterarbeit beworben – und bin über fünf Jahre und einen Umzug von Karlsruhe nach Hamburg später immer noch dabei. Du hast mich immer unterstützt, motiviert und inspiriert, und ich bin froh, dass wir *Kyripidia* zusammen neuen Aufschwung geben konnten! Danke für die Chance, in deiner Arbeitsgruppe zu promovieren. Danke für die stundenlangen Rebuttal-Sitzungen, die unser Paper letztendlich zu TibTech gebracht haben. Danke, für alles!

Liebe AG Gescher, ohne euch wäre die Promotion nicht die Zeit gewesen, die sie war! Egal ob beim Laborumzug, wenn die Mikroben mal wieder nicht wollten oder wenn (gerüchteweise durch uns verschuldet) das ganze Labor gestunken hat, ihr habt jede Situation zum Besseren gewendet. Und nicht nur auf der Arbeit, ich erinnere mich nur zu gerne an gemeinsame Opernbesuche, Kanuausflüge, Schnitzeljagden, Radtouren, Sommerfeste und Weihnachtsfeiern.

Lukas, Melanie, Janek und Kerstin, danke, dass ihr mich in der Zeit nach dem Umzug in euer Büro adoptiert habt und wir die Anfangszeit gemeinsam gemeistert haben. Danke für den wilden Lübeck-Ausflug, für das Wochenende in Berlin (Do you remember?), die gemeinsamen Dienste bei der Biocat oder die schöne Zeit in Luzern. Lukas, danke für deine stets analytische und konstruktive Sicht auf die Dinge, für die vielen Spieleabende und dafür, dass du mich immer nochmal gefragt hast, wie herum eine Gasflasche aufgedreht wird, bevor du alles in die Luft gejagt hättest. Melanie, danke für deine Freundschaft, dass ich dich immer um deinen wissenschaftlichen Rat bitten konnte und dafür, dass du uns immer noch so regelmäßig hier im Norden besuchst. Janek, dir möchte ich zum einen für die wissenschaftlichen Diskussionen danken, die mich immer ein gutes Stück vorangebracht haben. Zum anderen möchte ich dir dafür danken, dass du immer für mich da warst, in kleineren und größeren Krisen, und dass ich immer mein Herz bei dir ausschütten konnte! Niko, danke für die Fahrten zur BUGA mit dem Kofferraum voller Gebobacter und Shewanella und für deine stets offenen Worte.

Carmen, du kamst erst später zu uns, aber eine Kollegin, die besser in unsere kleine Gruppe passt hätten wir uns nicht wünschen können! Danke für Laugengebäck in allen Formen, für experimentelle Nächte auf dem Balkon und dafür, dass du die beste Gesprächspartnerin bist! René, danke für die Freude, die du jeden Tag ins Labor gebracht hast. Vivi, danke dass du so oft gemeinsame

Abendaktivitäten ins Leben gerufen hast und immer an alle gedacht hast. Jonas, danke für deine großartige Unterstützung bei allen bioinformatischen Problemchen, und für die gemütlichen Abende bei euch zuhause. Edi, danke dass wir zusammen durch die Waschmaschinen in Cold Hawaii gerollt sind!

Benni, Mahshid and Berivan, I want to thank you for being the best office I could have wished for! For focus times, coffee breaks and for the fact, that most of the time I had to hurry for emptying the dishwasher before one of you did it. And sorry for my loud typing :)

Sigi und Petra, ohne euch wäre die Arbeitsgruppe nicht das, was sie ist/war. Petra, egal welches Anliegen ich hatte, du wusstest immer weiter. Du warst, und bist eigentlich immer noch, die gute Seele dieser Arbeitsgruppe. Sigi, du dagegen bist der Spirit. Ich kenne niemanden sonst der so viel Leidenschaft, so viel Energie hat für das was er tut wie du. Es war mir die größte Freude, mit dir zusammen zu arbeiten, von dir zu lernen (und kleine Genussmomente mit dir zu teilen). Ich hoffe, dass wir es irgendwie schaffen im Kontakt zu bleiben!

Außerdem möchte ich allen meinen Freunden danken, insbesondere euch, Tanja, Ulrich, Philipp, Patricia und Anna. Danke, dass ihr immer Verständnis hattet, wenn es bei mir doch mal wieder später wurde als verabredet oder wir uns vielleicht etwas seltener gesehen haben als früher. Danke für viele schöne gemeinsame Urlaube, Telefonate und Erinnerungen. Zu wissen, dass es euch gibt hat mich oftmals aufrecht erhalten!

Ein besonderer Dank geht an meine Familie. Ich weiß, dass es für euch nicht leicht war, als ich entschieden habe, nach Hamburg zu ziehen. Ich finde, wir haben das trotzdem ziemlich gut hinkommen! Danke, dass ihr immer daran interessiert wart, wie die Doktorarbeit läuft, und dass ihr immer stolz auf mich wart. Liebe Oma, ich bin froh, deine Frage, ob ich denn nun endlich mal mit Schreiben angefangen habe, nach vier Jahren mit einem dicken „JA“ beantworten zu können!

Lieber Johannes, es gäbe so viel, was ich dir gerne sagen würde, aber ich belasse es hierbei: Danke für deine Unterstützung und dein immerwährendes Verständnis in dieser eher herausfordernden Phase, aber auch dafür, dass du mich immer wieder da raus geholt hast. Danke, dass du mich ins Buxtehuder Lokalkolorit eingeführt hast. Und du weißt ja: Ich mag dich mehr als Käsespätzle!

Inhaltsverzeichnis

Abstract	III
Zusammenfassung	IV
Danksagung	V
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	X
Abkürzungsverzeichnis	XI
1 Einleitung und Zielsetzung	1
1.1 Kohlenstoffdioxid als Rohstoff	1
1.1.1 Technische CO ₂ -Fixierung	1
1.1.2 Mikrobielle CO ₂ -Fixierung	3
1.2 Mikrobielle Elektrosynthese	6
1.2.1 Extrazellulärer Elektronentransfer	7
1.2.2 Wasserstoff als Elektronenshuttle	8
1.2.3 Biofilme	10
1.2.4 Anoxische mikrobielle Elektrosynthese	13
1.2.5 Oxische mikrobielle Elektrosynthese	15
1.3 Zielsetzung	18
2 Material und Methoden	20
2.1 Ressourcen	20
2.1.1 Mikroorganismen und Kultivierungsbedingungen	20
2.1.2 Verwendete Chemikalien und Gase	21
2.2 Knallgas-basierte Studien zum autotrophen Metabolismus	21
2.3 Bioelektrochemische Kultivierung	24
2.3.1 Elektrochemische Methoden	24
2.3.2 Aufbau der Fließzellen-Peripherie	24
2.3.3 Betrieb eines Biofilm-basierten elektroautotrophen Kultivierungsprozesses	26
2.3.4 Bestimmung der Gelöstsauerstoff-Konzentration	27
2.3.5 Optische Kohärenztomographie und Parameter zur Beschreibung des Bio-	
filmwachstums	27
2.3.6 Modellierung des Prozesses mit COMSOL Multiphysics	30
2.3.7 Bestimmung der Prozesseffizienz	34
2.4 Produktion eines mikrobiellen Speicherpolymers	35
2.4.1 Produktion des Speicherpolymers unter heterotropher und autotropher	
Kultivierung	35
2.4.2 Qualitativer Nachweis des Speicherpolymers	36
2.4.3 Extraktion des Speicherpolymers	37

2.4.4	Identifizierung des Speicherpolymers	37
2.5	Zugabe eines funktionalisierten Polymers zu dem Biofilm	38
2.6	Weitere Analytik	41
2.6.1	Korrelation der optischen Dichte mit der Zelltrockenmasse	41
2.6.2	Analyse der Biomassezusammensetzung	42
3	Ergebnisse	44
3.1	Abiotische Charakterisierung des bioelektrochemischen Systems	44
3.2	Wachstumskinetiken in Abhängigkeit des angelegten Potentials	46
3.3	Effizienzbetrachtungen	50
3.3.1	Modellierung des Prozesses in COMSOL	52
3.3.2	Coulomb'sche Effizienz	54
3.3.3	Energiebedarf	55
3.4	Voraussetzungen für den Betrieb eines kontinuierlichen Prozesses	58
3.4.1	Ernte des Biofilms	58
3.4.2	Wiederaufwuchs des Biofilms nach der partiellen Ernte	61
3.5	Mikrobiologische Produkte	62
3.5.1	Mikrobielles Protein	62
3.5.2	Mikrobielles Speicherpolymer	64
3.6	Einfluss der Zugabe eines funktionalisierten Polymers auf das Biofilmwachstum .	67
3.7	Anwendungsfall des Prozesses	76
4	Diskussion	80
4.1	Untersuchungen zum Arbeitselektrodenpotential für einen möglichst effizienten Betrieb der oxischen mikrobiellen Elektrosynthese	80
4.2	Etablierung und Nutzen der in-silico Modellierung des Prozesses in COMSOL . .	86
4.3	Erste Effizienzbetrachtungen für die oxische mikrobielle Elektrosynthese	87
4.4	Biomasse als Produkt: Ernte in der oxischen mikrobiellen Elektrosynthese	90
4.5	Mögliche Produkte aus der bioelektrochemischen Reduktion von CO ₂ mit <i>Kyrpidia spormannii</i>	92
4.6	Verkürzen der Anlaufphase des Prozesses durch Zugabe eines Biofilm-induzierenden Polymers	95
4.7	Untersuchung eines möglichen Anwendungsfalls	100
5	Fazit und Ausblick	102
	Literaturverzeichnis	104
	Anhang	118

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Mechanismen zum extrazellulären Elektronentransfer (EET)	7
Abb. 2	Anoxische mikrobielle Elektrosynthese (aMES)	14
Abb. 3	Oxische mikrobielle Elektrosynthese (oMES)	16
Abb. 4	Aufbau der Fließzellenperipherie	25
Abb. 5	Zyklische Voltammetrie zur abiotischen Charakterisierung des Systems	45
Abb. 6	Abiotische Korrelation des durch den gelösten Sauerstoff induzierten Stroms mit dem angelegten Potential	46
Abb. 7	Einfluss des Potentials auf das normalisierte Biovolumen, die Akkumulationsrate und den Bedeckungsgrad	48
Abb. 8	Höhenprofile der bei verschiedenen Potentialen aufgewachsenen Biofilme	50
Abb. 9	Entwicklung des relativen Biovolumens über die Zeit unter Sauerstofflimitierung	51
Abb. 10	Modellierte Konzentrationsprofile von Wasserstoff und Sauerstoff im Biofilm	53
Abb. 11	Coulomb'sche Effizienz des Prozesses	55
Abb. 12	Sonnenenergiebedarf von Biomasse-produzierenden Prozessen	57
Abb. 13	Abnahme des Biovolumens und der Oberflächenbedeckung mit abnehmendem Potential für die Biofilmernte	60
Abb. 14	Ablöseverhalten von natürlich gewachsenen Biofilmen im stationären Zustand	61
Abb. 15	Wiederaufwuchs des Biofilms nach einer partiellen Ernte	63
Abb. 16	Qualitativer Nachweis eines mikrobiellen Speicherpolymers	65
Abb. 17	NMR-Spektrum für den Extrakt aus heterotroph gewachsener Biomasse	67
Abb. 18	Beurteilung der Biofilmbildung mittels Kristallviolett	68
Abb. 19	Wachstumskurven der mit Polymer + Aldehyd versetzten Zellkulturen	70
Abb. 20	Lebend-Tot-Zellfärbung nach Biofilmwachstum mit Polymerzugabe	71
Abb. 21	Venn-Diagramm zur Transkriptomanalyse	73
Abb. 22	Polymerzugabe im bioelektrochemischen System	74
Abb. 23	Höhenprofile bei Polymerzugabe im bioelektrochemischen System	75
Abb. 24	Phasenkontrastaufnahmen der Polymer-Zell-Agglomerate aus der oMES	76
Abb. 25	Lebend-Tot-Färbung der Polymer-Zell-Agglomerate aus der oMES	77
Abb. 26	Wachstumsstudien mit industriellem Rauchgas als Substrat	78
Abb. 27	Elektroautotrophe Wachstumsstudie mit synthetischem Rauchgas als Substrat	79
Abb. 28	Wachstumsstudien bei 0 mV vs. SHE	82
Abb. 29	These zum Biofilmwachstum bei unterschiedlichen Potentialen	83
Abb. 30	Entstehungstheorie zur Entwicklung der turmartigen Biofilmstrukturen	85
Abb. 31	Elektronenverluste bei der mikrobiellen Elektrosynthese	88
Abb. 32	Unterquantifizierung des zu hohen Biofilms in den OCT-Aufnahmen	100
Abb. A1	Exemplarischer Verlauf des Biovolumens an allen drei Positionen über die Zeit	118
Abb. A2	Hauptkomponentenanalyse der Transkriptomanalyse	126

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Zusammensetzung des RR2A-Mediums	20
Tab. 2	Zusammensetzung des ES-Mediums	20
Tab. 3	Zusammensetzung des Wolfe's mineral elixir	21
Tab. 4	Parameter zur Modellierung der Konzentrationsprofile	32
Tab. 5	Zusammensetzung des adaptierten ES-Mediums	36
Tab. 6	Aldehyde zur Funktionalisierung des pAcU	39
Tab. 7	Zusammensetzung des Bradford-Reagenz	42
Tab. 8	Einfluss des Potentials auf das relative Biovolumen, die Akkumulationsrate, den Bedeckungsgrad und die Porosität	49
Tab. 9	Aminosäuren-Zusammensetzung für <i>K. spormannii</i>	64
Tab. 10	Elementarzusammensetzung des Extraktes aus autotropher Kultivierung	66
Tab. A1	Liste aller relevant hoch- oder herunterregulierten Gene	118

Abkürzungsverzeichnis

Ag/AgCl	Silber-Silberchlorid
aMES	anoxische mikrobielle Elektrosynthese
ATP	Adenosintriphosphat
BTM	Biotrockenmasse
BV	Biovolumen
CA	Chronoamperometrie
CBB-Zyklus	Calvin-Benson-Bassham-Zyklus
CCS	Abscheidung und Speicherung von Kohlenstoff (engl. Carbon Capture and Storage)
CCU	Abscheidung und Nutzung von Kohlenstoff (engl. Carbon Capture and Utilisation)
CE	Coulomb'sche Effizienz
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CP	Chronopotentiometrie
CV	Cyclovoltammetrie
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
EET	Extrazellulärer Elektronentransfer
EEW	Energy from Waste GmbH
EPS	Extrazelluläre Polymermatrix (engl. Extracellular Polymeric Substances)
GC	Gaschromatographie
H ₂	Wasserstoff
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HOB	Wasserstoffoxidierende Bakterien (engl. Hydrogen oxidizing bacteria)
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (engl. High Performance Liquid Chromatography)
LSV	Linear-Sweep-Voltammetrie
MBR	Membran-Biofilmreaktor
MES	Mikrobielle Elektrosynthese
MFC	Massendurchflussregler (engl. Mass Flow Controller)

NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NMR	Kernspinresonanz (engl. Nuclear Magnetic Resonance)
O ₂	Sauerstoff
OCT	Optische Kohärenz-Tomographie (engl. Optical Coherence Tomography)
OD ₆₀₀	Optische Dichte, bestimmt bei einer Wellenlänge von 600 nm
oMES	oxische mikrobielle Elektrosynthese
P(3)HB	Poly-(3)-Hydroxybuttersäure
P(4)HB	Poly-(4)-Hydroxybuttersäure
pAcU	Polyacetylen-Urea
PCE	Photokonversions-Wirkungsgrad (engl. Photoconversion-Efficiency)
PE	Polyethylen
PEEK	Polyether-Ether-Keton
PEM	Polymerelektrolytmembran
PHA	Polyhydroxyalkanoate
PHB	Polyhydroxybuttersäure
PHBV	Poly(3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyvalerat)
PP	Polypropylen
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (engl. Reactive Oxygen Species)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. revolutions per minute)
RuBisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase
SD	Standardabweichung (engl. Standard Deviation)
SHE	Standard-Wasserstoffelektrode (engl. Standard Hydrogen Electrode)
TOC	Gesamter organischer Kohlenstoff (engl. Total Organic Carbon)
TOCSY	Methode zur zweidimensionalen Kernspinresonanzspektroskopie (engl. Total Correlated Spectroscopy)
TRL	Technologie-Reifegrad (engl. Technology Readiness Level)

1 Einleitung und Zielsetzung

Der anthropogene Klimawandel stellt die Menschheit vor eine generationenübergreifende Herausforderung. Steigende Treibhausgasemissionen führen zu steigenden globalen Durchschnittstemperaturen, was verheerende Auswirkungen auf die globalen Ökosysteme hat. Insbesondere der menschliche Eingriff in den globalen Kohlenstoffkreislauf stellt ein Problem dar, da er das natürliche Gleichgewicht durcheinander bringt. Durch die Verbrennung fossiler Rohstoffe wie Rohöl oder Erdgas wird Kohlenstoffdioxid (CO_2) in die Atmosphäre emittiert, welches schon vor Millionen Jahren in der Erde gespeichert und somit dem Kreislauf entzogen wurde (Friedlingstein, 2015). CO_2 ist das Treibhausgas, das nach heutigem Wissen maßgeblich zum Treibhauseffekt und somit zur Klimaerwärmung beiträgt (Hofmann et al., 2006). Ein Großteil der fossilen Rohstoffe wird für die Energiegewinnung verbrannt. Über 8,5 % der geborgenen fossilen Ressourcen werden jedoch als Rohstoff in der chemischen Industrie verwendet (Zanon-Zotin et al., 2024). Um die Treibhausgasemissionen zu reduzieren, ist neben der Verwendung regenerativer Energiequellen eine Reduktion der Verwendung fossiler Ressourcen als Rohstoff wichtig. Gleichzeitig wächst der Bedarf nach Kohlenstoff als Rohstoff stetig (Hertwich, 2021). Deshalb etablierten sich in den letzten Jahren immer mehr Lösungen, die fossilen Ressourcen zu ersetzen. Hierbei spielen nachwachsende Rohstoffe eine wichtige Rolle. Eine Möglichkeit wäre beispielsweise die Verwendung von pflanzlicher Biomasse als Rohstoff. Solange es sich dabei jedoch nicht um ein Abfallprodukt aus der verarbeitenden Industrie handelt, steht zugleich die Frage des Flächennutzungskonfliktes mit der Lebensmittelproduktion zur Diskussion (Henry, 2010). Um diesen Konflikt zu vermeiden, können Produktionsprozesse auch auf Abfall als Rohstoff auslegt sein. Neben organischen Abfällen kann hier auch CO_2 direkt als Kohlenstoffquelle dienen (Kircher und Schwarz, 2020).

1.1 Kohlenstoffdioxid als Rohstoff

1.1.1 Technische CO_2 -Fixierung

Die Nutzung von Kohlenstoffdioxid als Rohstoff stellt die nachhaltigste Alternative für kohlenstoffbasierte Produktionstechnologien dar, sofern erneuerbare Energien als Energiequellen genutzt werden (Kircher und Schwarz, 2020). Neben der Vermeidung zusätzlicher Emissionen durch die Verwendung fossiler Ressourcen kann der Atmosphäre bereits emittiertes CO_2 wieder entzo-

gen werden. Wird der Kohlenstoff im Anschluss temporär oder langfristig gespeichert, handelt es sich um sogenannte Carbon-Capture-and-Storage-Technologien (CCS). Wird das CO₂ jedoch als Kohlenstoffquelle in einem Produktionsprozess verwendet, handelt es sich um Carbon-Capture-and-Utilisation (CCU).

Die meisten technischen Verfahren zur Verwertung von CO₂ haben gemein, dass die atmosphärische CO₂-Konzentration mit 0,04 % zu gering ist, um die Prozesse effizient betreiben zu können. Deshalb wird häufig auf sogenannte Punktquellen zurückgegriffen. Hier fallen industrielle Abgase aus Verbrennungsprozessen, Fermentationsprozessen oder anderen Industriesektoren in großen Mengen an. Diese Gase enthalten neben CO₂ meist Sauerstoff, Stickstoff oder Wasser. Auch andere, möglicherweise kritische Komponenten wie Feinstaub, Stickoxide, Kohlenmonoxid oder Schwermetalle können enthalten sein (Kircher und Schwarz, 2020).

Ein Beispiel für den Einsatz von Kohlenstoffdioxid als Rohstoff in der Industrie ist das sogenannte Synthesegas. Viele chemische Synthesen bauen auf Synthesegas als Rohstoff auf. Dabei handelt es sich um ein Gasgemisch, welches meist aus Kohlenmonoxid (CO) und Wasserstoff (H₂) besteht. Kohlenstoffdioxid kann zusammen mit Methan in einer endothermen Reaktion zu Synthesegas reformiert werden. Synthesereaktionen, die auf dem Synthesegas basieren, sind beispielsweise die Methanolsynthese oder die Ammoniaksynthese nach Haber und Bosch, wobei in letzterer der Wasserstoff aus dem Synthesegas mit Stickstoff zu Ammoniak reformiert wird (Kircher und Schwarz, 2020; Mota und Kim, 2019). Aber auch längerkettige Kohlenwasserstoffe können durch Nutzung der Fischer-Tropsch-Synthese aus Synthesegas hergestellt werden (Fischer und Tropsch, 1927; Inderwildi et al., 2008). Solcherlei Prozesse sind sehr energieintensiv. Dennoch ist es sinnvoll, diese großtechnisch einzusetzen, solange erneuerbare Energien verwendet werden. So kann das Abfallprodukt CO₂ in höherwertige Produkte umgewandelt werden und dadurch zugleich als Energieträger dienen (Kircher und Schwarz, 2020).

Jedoch ist Kohlenstoffdioxid ein sehr reaktionsträges Molekül. Mit einer Standard-Gibbs-Energie von $\Delta G_f^0 = -396 \text{ kJ mol}^{-1}$ bedarf es starker Katalysatoren, um CO₂ aus seiner stabilen Form in ein anderes Molekül umzuwandeln (Aresta et al., 2014). Chemische Katalysatoren sind jedoch oft nicht robust gegenüber Verunreinigungen, welche häufig in Form von Schadstoffen, oder auch anderer Gase wie Sauerstoff, in CO₂-haltigen Abgasen vorkommen. So kommt es bei chemisch katalysierten Umwandlungsprozessen von CO₂ häufig nur zu geringen Ausbeuten, und eine langfristige Wiederverwendbarkeit der Katalysatoren ist nicht gegeben (Kruse et al., 2015). Deshalb werden auch in technischen Prozessen immer häufiger biologische Katalysatoren verwendet. Diese sind aufgrund der hohen Spezifität und Selektivität der Enzyme, welche die CO₂-Fixierung

katalysieren, robust gegen Verunreinigungen im Edukt (Zheng et al., 2017). Im Vergleich zu den zuvor beschriebenen chemisch katalysierten Verfahren arbeiten die biologisch katalysierten Verfahren unter milderen Reaktionsbedingungen und bedürfen geringerer Energieeinträge (Schmid et al., 2001).

Die Lebensform, bei welcher CO₂ als alleinige Kohlenstoffquelle dient, wird Autotrophie genannt. In der Natur ist der bedeutendste Stoffwechselweg zur Fixierung von CO₂ die oxygene Photosynthese (Baslam und Sanz-Saez, 2023; Bar-Even et al., 2012). Diese wird von Pflanzen, Algen und einigen Bakterien betrieben. Hierbei wird CO₂ unter Nutzung von Lichtenergie in Biomasse fixiert (Junge, 2019). Dieser Stoffwechsel wird auch als Photoautotrophie bezeichnet. Somit steht also theoretisch eine große Menge an Biomasse zur Verfügung, welche aus der Fixierung von CO₂ entstanden ist. Pflanzen-Biomasse bietet jedoch kaum Wertschöpfungspotential. Sie kann für die Herstellung von Biokraftstoffen oder zur Energie- und Wärmegewinnung durch Verbrennung verwendet werden (Koch et al., 2016). Jedoch ist die Kultivierung großer Landpflanzen zeitintensiv und hat einen großen Flächenbedarf. Im Gegensatz dazu steht die CO₂-Fixierung mithilfe von Mikroorganismen. Neben der Photoautotrophie existiert hier zudem noch eine weitere Möglichkeit der biokatalytischen CO₂-Fixierung. Einige Mikroorganismen sind in der Lage, CO₂ unter Verwendung von Wasserstoff als Energiequelle zu fixieren (Kracke et al., 2015). Diese Stoffwechsel-Fähigkeit wird Lithoautotrophie genannt. Im folgenden Kapitel soll näher auf die mikrobielle CO₂-Fixierung eingegangen werden.

1.1.2 Mikrobielle CO₂-Fixierung

Um den Kohlenstoff in CO₂ für den Aufbau von Biomasse zu verwenden, muss dieser reduziert werden. Kohlenstoff in CO₂ hat eine Oxidationszahl von +IV, während der Oxidationszustand des Kohlenstoffs in Biomasse im Durchschnitt negativ ist (Toscano et al., 2012). Es müssen also Reduktionsäquivalente bereitgestellt werden, wofür Energie benötigt wird. Diese Energie kann aus Licht oder aus chemischen Reaktionen gewonnen werden. In phototrophen Organismen, wie Pflanzen oder Cyanobakterien, wird hierzu in der sogenannten Lichtreaktion zunächst Wasser unter Zuhilfenahme von Lichtenergie gespalten, wobei Sauerstoff, Protonen und Elektronen frei werden. Alternativ kann die benötigte Energie jedoch auch aus der Oxidation von anorganischen Verbindungen gewonnen werden. Diese Art des Stoffwechsels kann in chemolithoautotrophen Organismen gefunden werden. Als Elektronendonoren dienen beispielsweise Schwefelwasserstoff (H₂S), Ammoniak (NH₃), Eisen-(II)-Ionen (Fe²⁺) oder Wasserstoff (H₂) (Berg et al., 2010). Organismen, die Wasserstoff oxidieren, werden als Knallgasbakterien bezeichnet. Die bei Oxi-

dation der anorganischen Substrate frei werdenden Elektronen werden über eine Elektronentransportkette in der Zellmembran weitergeleitet. Dabei wird ein Protonengradient aufgebaut. Dieser treibt ATP-Synthasen an, welche ebenfalls in der Zellmembran lokalisiert und für die Synthese des Energieträgers Adenosintriphosphat (ATP) zuständig sind. Diese Energie wird im Rahmen des reversen Elektronentransportes genutzt, um Elektronen auf das Elektronenschuttle Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADP^+) zu übertragen, wodurch NADPH entsteht. Sowohl ATP als auch NADPH werden für die Fixierung von CO_2 benötigt (Massazza et al., 2021). Dabei haben die einzelnen Stoffwechselwege einen unterschiedlich großen Energiebedarf.

Der auf der Erde am häufigsten vorkommende Stoffwechselweg zur Fixierung von CO_2 ist der reduktive Pentosephosphatzyklus, oder auch Calvin-Benson-Bassham-Zyklus (CBB) (Fuchs, 2011). Das Schlüsselenzym des CBB-Zyklus ist die Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase (RuBisCO). Diese bindet das CO_2 an den C_5 -Zucker Ribulose-1,5-Bisphosphat. Aus dieser Verbindung entstehen zwei Moleküle 3-Phosphoglycerat. Durch Reduktion dieser Moleküle können energiereiche organische Verbindungen wie Zucker oder Fette hergestellt werden (Berg et al., 2010; Kajla et al., 2022). Das Enzym RuBisCO hat neben seiner Funktion als Carboxylase jedoch auch eine Nebenaktivität als Oxygenase. In oxischen Bedingungen wird statt CO_2 also O_2 an das Ribulose-1,5-Bisphosphat gebunden. Diese Nebenaktivität macht den CBB-Zyklus in Bezug auf die Fixierung von CO_2 ineffizienter. Deshalb liegt der durchschnittliche Bedarf für die Produktion eines Moleküls Pyruvat bei sieben Molekülen ATP (Bar-Even et al., 2012; Fuchs, 2011).

Der reduktive Acetyl-Coenzym A (CoA)-Stoffwechselweg, oder auch Wood-Ljungdahl-Weg, ist ein Metabolismus zur CO_2 -Fixierung, der unter strikt anoxischen Bedingungen abläuft. Aus Kohlenstoffdioxid entsteht dabei zunächst Acetyl-CoA, welches weiter umgewandelt werden kann. Das Endproduktspektrum beschränkt sich jedoch meist auf C_1 - und C_2 -Verbindungen. Beispielsweise können acetogene Bakterien aus Acetyl-CoA Essigsäure herstellen. Methanogene Archaeen dagegen nutzen eine abgewandelte Form des Wood-Ljungdahl-Wegs, um Methan zu produzieren. Mit nur einem Molekül ATP, das für die Pyruvatsynthese aus CO_2 theoretisch benötigt wird, ist dieser Stoffwechselweg zur CO_2 -Fixierung derjenige mit dem geringsten Energiebedarf (Berg et al., 2010; Fuchs, 2011). Jedoch ist auch die Energieausbeute gering, weshalb Organismen, die diesen Stoffwechselweg nutzen, dies durch eine hohe Umsatzrate ausgleichen (Schuchmann und Müller, 2014).

Bei dem reduktiven Krebs-Zyklus (auch: reduktiver Citratzyklus) wird, wie der Name vermuten

lässt, der Citratzyklus rückwärts durchlaufen. Dabei entsteht aus dem fixierten CO_2 zunächst Pyruvat, welches dann zu Acetyl-CoA umgewandelt wird. Genau wie bei dem Wood-Ljungdahl-Weg sind auch hier die involvierten Enzyme sensitiv gegenüber Sauerstoff, jedoch nicht komplett intolerant. Deshalb kann diese Art der CO_2 -Fixierung oft in fakultativ anaeroben oder mikroaerophilen Organismen gefunden werden. Mit zwei bis drei Molekülen ATP für die Herstellung eines Moleküls Pyruvat aus CO_2 ist auch der reduktive Citratzyklus energieeffizienter als der CBB-Zyklus, jedoch weniger effizient als der Wood-Ljungdahl-Weg (Berg et al., 2010; Fuchs, 2011).

Die drei beschriebenen Stoffwechselwege zur Fixierung von CO_2 in Mikroorganismen und Pflanzen sind in der biotechnologischen Anwendung am weitesten verbreitet und damit die für diese Arbeit relevantesten. In der Literatur werden jedoch noch weitere mögliche CO_2 -Fixierungswege beschrieben, darunter der 3-Hydroxypropionatzyklus, der 3-Hydroxypropionat/4-Hydroxybutyrat-Zyklus oder der Dicarboxylat/4-Hydroxybutyrat-Zyklus (Berg et al., 2010; Berg, 2011; Fuchs, 2011; Kajla et al., 2022). Es wird davon ausgegangen, dass noch weitere Wege zur Fixierung von Kohlenstoff existieren, diese bisher jedoch noch nicht entdeckt worden sind. Auch synthetische Wege zur biotechnologischen Fixierung von CO_2 sind denkbar. Diese kombinieren Enzyme verschiedener Stoffwechselwege miteinander und umgehen so deren einzelne Schwächen (Schwander et al., 2016; Bar-Even et al., 2010).

Die mikrobielle CO_2 -Fixierung findet bereits teilweise großtechnische Anwendung. Ein Beispiel ist die Kultivierung von Mikroalgen. Diese können CO_2 mithilfe von Lichtenergie fixieren und daraus hochwertige Produkte, wie beispielsweise Lipide, Pigmente oder Proteine herstellen. Die Mikroalgen werden dabei in sogenannten Photobioreaktoren kultiviert. Diese Art der Kultivierung wird oft als "zweidimensional" bezeichnet. Der Nachteil ist auch hier der sehr große Flächenbedarf für eine ausreichende Lichtversorgung (Khan et al., 2018; Kircher und Schwarz, 2020). Des Weiteren erfordert die konstante Umwälzung hohe Energieeinträge, die einen Algen-basierten Prozess zur CO_2 -Fixierung unwirtschaftlich machen können (da Silva und Reis, 2015).

Die Firma LanzaTech hat sich dagegen die CO_2 -Fixierung über den Wood-Ljungdahl-Weg in acetogenen Bakterien zunutze gemacht. Sie nutzen die CO_2 -haltigen Abgase aus der Stahlindustrie, um Ethanol zu produzieren. Wie bereits zuvor beschrieben, ist der Energiebedarf dieser Reaktion sehr gering. Allerdings müssen die Fermentationen strikt anoxisch ablaufen, und das Produktspektrum ist auf C_1 - und C_2 -Verbindungen beschränkt (Kircher und Schwarz, 2020).

Knallgasbakterien leben unter oxischen Bedingungen. Sauerstoff als Elektronenakzeptor hat ein höheres Redoxpotential als CO_2 . Dadurch steht den Knallgasbakterien mehr Energie für die

Produktbildung zur Verfügung, was ein breiteres Produktspektrum ermöglicht. Dennoch sind bisher kaum Produktionsprozesse mit Knallgasbakterien etabliert. Das liegt vor allem an der technischen Herausforderung bei Gasfermentationen mit Wasserstoff und Sauerstoff (Kircher und Schwarz, 2020). Ein mögliches Reaktorkonzept für diese Art der Fermentation wäre ein Membran-Biofilmreaktor (MBR). Die Technologie stammt aus der Abwasserbehandlung, kann aber an die Knallgas-Fermentation angepasst werden (Martin und Nerenberg, 2012). Dabei werden diffusionspermeable Hohlfasermembranen von einem Gas, beispielsweise Wasserstoff, durchströmt. Dieses kann über die Membran in die Flüssigphase diffundieren. Über die Flüssigphase können Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid zur Verfügung gestellt werden. Die Mikroorganismen wachsen als Biofilm auf der Oberfläche der Membranfasern und werden von zwei Seiten mit Gas versorgt. Auf diese Weise können die Gasphasen von einander getrennt und die Bildung einer explosiven Gasmischung vermieden werden (Elisiário et al., 2022; Nerenberg, 2016). Eine weitere Option zur sicheren Kultivierung der Knallgasbakterien ist die oxische Mikrobielle Elektrosynthese (oMES). Dabei entsteht Wasserstoff in-situ an einer Elektrode. Die Mikroorganismen wachsen als Biofilm direkt auf der Elektrode und können so den Wasserstoff direkt aufnehmen. Auch hier können die restlichen Gase (CO_2 und O_2) über die Flüssigphase zur Verfügung gestellt werden. So kann die Bildung einer explosiven Gasmischung ebenfalls vermieden werden.

1.2 Mikrobielle Elektrosynthese

Die mikrobielle Elektrosynthese ist eine mikrobiell katalysierte, elektrochemische Fixierung von CO_2 . In einer wässrigen Umgebung wird ein negatives Potential an einer Kathode angelegt. An der Anode kommt es dadurch zur Elektrolyse von Wasser. Die dabei frei werdenden Elektronen werden von der Kathode wieder an die Umgebung abgegeben und wirken somit reduzierend. Kohlenstoffdioxid liegt in gelöster Form im Medium vor. Für die Reduktion von CO_2 ist, wie bei jeder Reduktionsreaktion, ein Aktivierungspotential zu überwinden. Dieses kann durch die Verwendung eines Katalysators reduziert werden. Bei der mikrobiellen Elektrosynthese dienen Mikroorganismen als Katalysator. Diese können das CO_2 über diverse Stoffwechselwege in organischen Molekülen fixieren, welche dann entweder für die Bildung weiterer mikrobieller Biomasse oder für die Herstellung spezieller mikrobieller Produkte verwendet werden (Rabaey und Rozendal, 2010; Logan et al., 2019). Als Energiequelle dient hier einzig elektrischer Strom. Die mikrobielle Elektrosynthese stellt damit eine Möglichkeit dar, elektrische Energie in chemische

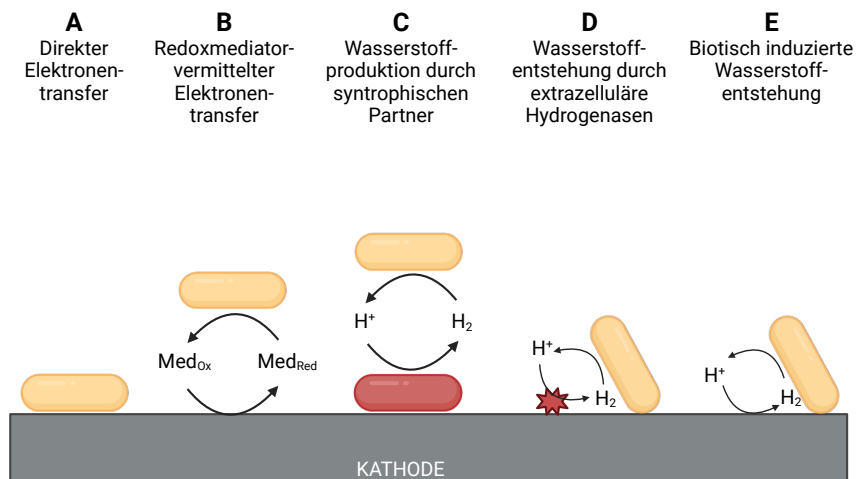


Abbildung 1: Mechanismen zum extrazellulären Elektronentransfer (EET). **A** - Direkter Elektronentransfer; **B** - Elektronentransfer, der über einen löslichen Redoxmediator vermittelt wird; **C** - Wasserstoffvermittelter Elektronentransfer, wobei der Wasserstoff von einem syntrophischen Partner produziert wird, der zur direkten Elektronenübertragung fähig ist; **D** - Wasserstoffvermittelter Elektronentransfer, wobei die Wasserstoffentstehung durch extrazelluläre Hydrogenasen katalysiert wird; **E** - Wasserstoffvermittelter Elektronentransfer, wobei die Wasserstoffentstehung durch den biotischen Verbrauch und damit die Reduktion des Wasserstoffpartialdrucks weiter induziert wird. Die Abbildung wurde leicht abgewandelt aus Philips et al. (2020) übernommen und mithilfe von Biorender.com erstellt.

Energie umzuwandeln. Das ist insbesondere für die Speicherung überschüssiger Stromproduktion aus erneuerbaren Energien interessant.

Der elektrische Strom kann von den Mikroorganismen entweder direkt oder über ein Elektronen Shuttle aufgenommen werden. Einen Überblick über Möglichkeiten zum extrazellulären Elektronentransfer liefert das folgende Kapitel.

1.2.1 Extrazellulärer Elektronentransfer

Die Übertragung von Elektronen von einer Kathode an mikrobielle Zellen kann entweder direkt oder indirekt über einen Mediator stattfinden. Eine Auswahl der einzelnen Mechanismen ist in Abb. 1 gezeigt. Beim direkten Elektronentransfer (A) besteht direkter Kontakt zwischen den Mikroorganismen und der Elektrodenoberfläche, und die Elektronen werden ohne Zuhilfenahme eines Redoxmediators übertragen. Die Fähigkeit zur direkten Elektronenübertragung von Mikroorganismen an einen unlöslichen Elektronenakzeptor ist schon länger bekannt (Philips et al., 2016; Caccavo et al., 1994; Rabaey et al., 2004). Modellorganismen unter diesen exoelektrogenen Mikroorganismen, die zur direkten Elektronenübertragung an eine Anode fähig sind, sind *Geobacter sulfurreducens* und *Shewanella oneidensis*. Grundlage des extrazellulären Elektronentransfers

sind für beide Spezies die *c*-Typ Cytochrome, die in der äußeren Zellmembran gebunden sind und den Elektronentransport aus der Zelle heraus zur Anode ermöglichen (Philips et al., 2016; Shi et al., 2007). Zusätzlich können *Shewanella* spp. den Elektronentransfer häufig durch Sekretion von Flavinen als Redoxmediatoren unterstützen. Für einige Spezies scheint die Fähigkeit zur direkten Elektronenabgabe an eine Anode auch reversibel zu sein, sodass Elektronen von einer Kathode im direkten Kontakt aufgenommen werden könnten (Ross et al., 2011; Rozendal et al., 2008). Der Nachweis der direkten Elektronenaufnahme von einer Kathode ist jedoch schwierig, da mit Anlegen eines ausreichend negativen Potentials zugleich meist Wasserstoff entsteht, welcher für die meisten elektrotrophen Mikroorganismen als Elektronenüberträger dienen kann. Im Jahr 2004 konnten Gregory und Kolleg:innen jedoch für die Spezies *Geobacter metallireducens* und *Geobacter sulfurreducens* eine direkte Elektronenaufnahme von einer Kathode zweifelsfrei nachweisen (Gregory et al., 2004). Häufig wird die Fähigkeit zum direkten Elektronentransfer jedoch nur aus Genomanalysen postuliert (Rowe et al., 2018).

Bei der indirekten Elektronenübertragung zwischen einer unlöslichen Elektrode und mikrobiellen Zellen bedarf es eines Redoxmediators (B). In kathodischen bioelektrochemischen Systemen wird der Mediator zunächst an der Kathode reduziert. Bei Kontakt mit den mikrobiellen Zellen können die Elektronen an die Mikroorganismen abgegeben werden. Der Redoxmediator wird dadurch oxidiert und kann erneut Elektronen aufnehmen. Mögliche Mediator-Systeme sind Flavine, H_2/H^+ , Formiat/ $\text{H}^+ + \text{CO}_2$, $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ oder $\text{NH}_3/\text{NO}_2^-$ (Tremblay et al., 2017). Die reduzierte Version des Mediators wurde hierbei stets zuerst genannt. Die wasserstoffvermittelte Elektronenübertragung (C - E) ist bei acetogenen und methanogenen Organismen, aber auch bei Knallgasbakterien relevant. Deshalb soll im Folgenden näher darauf eingegangen werden.

1.2.2 Wasserstoff als Elektronenshuttle

Die Gruppe der wasserstoffoxidierenden Bakterien (engl. Hydrogen oxidizing bacteria, HOB) umfasst ein breites Spektrum an aeroben, fakultativen und anaeroben bakteriellen Spezies. Alle haben gemein, dass sie Wasserstoff (H_2) als Elektronendonator nutzen können (Lin et al., 2022). Dabei wird der Wasserstoff von meist membrangebundenen Hydrogenasen in je zwei Elektronen und zwei Protonen gespalten. Die Elektronen können von den Organismen auf die Elektronentransportkette übertragen werden, welche letztlich die ATP-Synthese antreibt (Vignais, 2008). Auch für den in dieser Arbeit verwendeten Organismus, *Kyrpidia spormannii*, wurde ein wasserstoffabhängiger Elektronenimport postuliert (Reiner et al., 2020).

Mit Anlegen eines negativen Potentials an die Arbeitselektrode in einem wässrigen System kann

die Wasserstoffbildung induziert werden. Das Potential, welches mindestens an der Kathode angelegt werden muss, um unter den gegebenen Bedingungen Wasser in Wasserstoff und Sauerstoff aufzuspalten, kann dabei mithilfe der Nernst-Gleichung berechnet werden. Dieses Potential wird auch als das Wasserstoffentstehungspotential bezeichnet. Die Nernst-Gleichung, bezogen auf die elektrolytische Wasserstoffentstehung, ist in Gleichung 1.1 beschrieben.

$$E = E^\circ + \frac{RT}{2F} \cdot \ln \left(\frac{p_{H_2}}{[H^+]^2} \right) \quad (1.1)$$

E° ist mit 0 V bezogen auf die Standardwasserstoffelektrode (engl. Standard Hydrogen Electrode, SHE) das Potential für Wasserstoffentstehung unter Standardbedingungen (pH 0, 1 atm H_2). R beschreibt die ideale Gaskonstante mit $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, T die Temperatur in Kelvin und F die Faraday-Konstante ($96,485 \text{ kJ V}^{-1}$). In der Klammer wird der Wasserstoffpartialdruck p_{H_2} in atm durch die Protonenkonzentration $[H^+]^2$ in mol L^{-1} dividiert (Philips, 2020).

Das Wasserstoffentstehungspotential, welches mithilfe der Nernst-Gleichung bestimmt werden kann, beschreibt jedoch nur das minimal nötige Potential, um die Reaktion unter idealen Bedingungen ablaufen zu lassen. Durch Faktoren wie den internen Widerstand der Elektrode oder kinetische Hürden wird in der Realität allerdings ein höheres Potential benötigt, um die Reaktion ablaufen zu lassen. Die Differenz zwischen dem theoretischen und dem tatsächlichen Entstehungspotential wird Überspannung genannt (Bard und Faulkner, 2001). Dieser Effekt wirkt sich auf die Wasserstoffentstehungsrate aus (Philips, 2020). Die theoretische Berechnung der Überspannung, und somit des tatsächlichen Wasserstoffentstehungspotentials, hängt von vielen Faktoren wie den Elektrodenmaterialien, der Zusammensetzung des Elektrolytmediums oder der Geometrie der elektrochemischen Zelle ab. Deshalb ist es häufig einfacher, das Potential, ab welchem eine Wasserstoffentstehung im System auftritt, experimentell zu bestimmen. Ein solches Experiment wurde unter anderem von Vevin und Kolleg:innen durchgeführt (2011). Dabei konnte jedoch beobachtet werden, dass ein Wachstum von wasserstoffoxidierenden Bakterien möglich war, obwohl in einem identischen, abiotischen System noch keine Wasserstoffentstehung bei demselben Potential gemessen wurde. Das legt die Vermutung nahe, dass die Mikroorganismen das Entstehungspotential von Wasserstoff herabsetzen können.

Hierbei konnten verschiedene Theorien bereits überprüft und bestätigt werden (Philips, 2020). Wie in Abb. 1 C postuliert, kann es zu einer Symbiose zweier syntrophischer Organismen kommen. Wenn einer der beiden Partner zur direkten Elektronenaufnahme fähig ist und gleichzeitig selbst Wasserstoff produziert, kann der andere Partner davon profitieren. So dient Wasserstoff

zwar als Elektronendonator, wird aber nicht elektrochemisch produziert. Die Entstehung ist somit auch nicht von dem angelegten Potential abhängig (Marshall et al., 2017). Auch eine enzymatische Katalyse der elektrochemischen Wasserstoffentstehung (Abb. 1 D) konnte bereits beobachtet werden. Bei der mikrobiellen Elektrosynthese wurde ein Kulturmedium verwendet, welches bereits zuvor in einer anderen Kultivierung eingesetzt wurde. Dabei wurde eine größere Wasserstoffentstehungsrate beziehungsweise auch ein geringeres Entstehungspotential im Vergleich zu dem Kontrollversuch mit frischem Medium beobachtet (Tremblay et al., 2019; Deutzmann et al., 2015). Die genauen Komponenten, die für diese Effekte verantwortlich sind, konnten noch nicht identifiziert werden, aber vermutlich enthielt das Medium extrazelluläre Enzyme, wie beispielsweise Hydrogenasen, welche an der Kathodenoberfläche adsorbierten und dort die Wasserstoffentstehung katalysierten (Philips, 2020). Aber auch der mikrobielle Wasserstoffverbrauch kann einen direkten Einfluss auf das Entstehungspotential haben (Abb. 1 E). Die Nernst-Gleichung zeigt, dass neben der Temperatur auch der pH-Wert des Mediums sowie der bereits vorliegende Wasserstoffpartialdruck das Wasserstoffentstehungspotential beeinflussen. Eine aktive HOB-Kultur hält mit ihrem Wasserstoffverbrauch den Partialdruck des Wasserstoffs dauerhaft niedrig. Dieser Effekt kann das Entstehungspotential im biotischen System im Vergleich zu einem identischen, abiotischen System verringern (Philips, 2020; Rheinländer et al., 2014).

Unabhängig davon, ob die Elektronenübertragung direkt zwischen den Zellen und der Elektrode stattfindet, oder ob ein Redoxmediator involviert ist, ist eine geringe räumliche Distanz zwischen den Zellen und der Elektrode entscheidend. Die effizienteste Form des mikrobiellen Wachstums in einem bioelektrochemischen System ist also das Wachstum als Biofilm (Vassilev et al., 2022). Neben der effizienteren Elektronenaufnahme in der MES bieten Biofilme noch einige weitere Vorteile für die Kultivierung in biotechnologischen Prozessen, welche im folgenden Kapitel erläutert werden.

1.2.3 Biofilme

Biofilme wachsen, im Gegensatz zu planktonischen Zellkulturen, an einer Oberfläche anhaftend. Die Zellen schließen sich dabei zu Aggregaten zusammen, die in eine Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eingebettet sind (Flemming et al., 2016). Die erste technische Nutzung von Biofilmen wurde in den 1980er-Jahren im Abwassersektor eingeführt (Bouwer und Crowe, 1988). Biofilme wurden hier hauptsächlich zur Oxidation organischer Kohlenstoffe, zur Denitrifizierung oder als Filter eingesetzt. Dabei wurde sich unter anderem die erhöhte Robustheit von Biofilmen gegenüber stark schwankenden Umgebungsbedingungen zunutze gemacht.

Diese wird durch die EPS-Matrix gewährt. Daneben haben Biofilme aber noch einige weitere Eigenschaften, die sich vorteilhaft auf einen Kultivierungsprozess auswirken. Sie sind stabiler gegenüber mechanischen Belastungen und resistenter gegen Kontaminationen im Vergleich zu planktonischen Zellkulturen. Nährstoffe können von der EPS-Matrix eingeschlossen und damit einfacher verfügbar gemacht werden (Weiler et al., 2024; Halan et al., 2012; Flemming et al., 2016; Flemming und Wingender, 2010). Zudem treten in Biofilmen hohe Zelldichten auf, die auf natürliche Weise in einem Reaktor zurückgehalten werden. Diese Eigenschaft zur retentostaten Kultivierung, zusammen mit der hohen Zelldichte, erhöht die Produktivität von Biofilmsystemen im Vergleich zu planktonischen Kulturen. Studien haben zudem gezeigt, dass die Immobilisierung von Zellen an einer Oberfläche zu einer Entkopplung von Wachstum und Produktion führen kann. So konnte beispielsweise eine Biofilm-Kultur von *Zymomonas mobilis* deutlich höhere Ethanol-Ausbeuten erreichen als eine planktonische Kultur unter vergleichbaren Bedingungen (Todhanakasem et al., 2014).

Insbesondere in produktiven Prozessen haben also Biofilme einige Vorteile gegenüber planktonischen Kulturen. Dazu gehört auch die erleichterte kontinuierliche Betriebsweise aufgrund der natürlichen Zellrückhaltung und Langzeitstabilität von Biofilmen. Auch Gasfermentationen werden durch Reaktorkonzepte wie beispielsweise den Membran-Biofilmreaktor (s. Kapitel 1.1.2) erleichtert. Jedoch gibt es auch bei der Kultivierung von Biofilmen einige Herausforderungen, insbesondere bei der Hochskalierung der Prozesse. Geeignete Reaktorkonzepte für den Betrieb von Biofilmprozessen im großen Maßstab sind nicht gängig. Die Startphase der Prozesse dauert im Vergleich zu planktonischen Kultivierungen länger, da ein Biofilm erst aufwachsen muss. Zudem können die initialen Kosten bei dem Betrieb eines Biofilmprozesses höher sein, da die Reaktortechnologien häufig komplexer sind als bei einem einfachen Rührkesselreaktor (Weiler et al., 2024; Leonov et al., 2021; Schmeckeber et al., 2022).

Eine weitere Herausforderung, besonders in der Biofilmforschung, ist die Visualisierung und Quantifizierung von Biofilmen. Die Methoden zur Visualisierung von Biofilmen unterscheiden sich grundsätzlich in ihrer Auflösung. Während einige Methoden den Biofilm im mikroskopischen Maßstab abbilden, arbeiten andere Verfahren eher im mesoskopischen Maßstab. In der Literatur werden einige mikroskopische Methoden beschrieben, von der klassischen Lichtmikroskopie über die Fluoreszenzmikroskopie bis hin zur Elektronen- oder Rasterkraftmikroskopie (Surman et al., 1996). All diese Methoden haben gemein, dass nur sehr kleine Bereiche des Biofilms abgebildet werden können. Eine großflächige Analyse würde viel Zeit in Anspruch nehmen. Zudem ist die Probenvorbereitung teilweise sehr aufwändig, und eine Visualisierung kann nur als Endpunkt-

analyse durchgeführt werden (Halan et al., 2012; Wagner und Horn, 2017).

Soll ein Biofilmprozess in Echtzeit beobachtet werden, sind die Anforderung an die bildgebenden Verfahren jedoch höher. Die Aufnahmen dürfen nicht invasiv und nicht destruktiv sein, zudem müssen sie ohne zeitliche Verzögerung stattfinden und dürfen keine Probenvorbereitung erfordern. Diesen Anforderungen entspricht die optische Kohärenztomographie (OCT). Es handelt sich dabei um eine bildgebende Methode, welche im meso- bis makroskopischen Bereich arbeitet. Dabei werden Strukturen ab einer Größe von 1 mm untersucht. Im Gegensatz zu mikroskopischen Methoden können größere Bildbereiche aufgenommen werden, jedoch mit geringerer Auflösung. Dadurch können morphologische Informationen, wie beispielsweise die durchschnittliche Dicke eines Biofilms, besonders gut bestimmt werden. Das Prinzip basiert auf der Emission eines Lichtstrahls mit definierter Wellenlänge ($930 \text{ nm} \pm 50 \text{ nm}$) aus einer Lichtquelle, welcher zunächst auf einen Strahlteiler trifft. Ein Teil des Lichtstrahls trifft auf einen Spiegel und wird ungehindert reflektiert. Der andere Teil trifft auf die Probe, wo er gestreut und reflektiert wird. Durch Überlagerung der Reflektionssignale beider Lichtstrahlen und anschließender Fourier-Transformation der Interferenzen können eindimensionale Tiefeninformationen in z-Richtung aus der zu untersuchende Probe gewonnen werden (Huang et al., 1991; Bouma und Tearney, 2001). Diese Profile werden als A-Scan bezeichnet. Viele solcher Aufnahmen entlang der x-Achse bilden ein zweidimensionales Bild ab, welches als B-Scan bezeichnet wird. Durch das Aufreihen vieler B-Scans in y-Richtung entsteht eine dreidimensionale Tiefeninformation, der sogenannte C-Scan (Wagner et al., 2010). Die Aufnahmen werden im zweidimensionalen Format ausgewertet. Dabei werden die Tiefeninformationen als Grauwerte der einzelnen Pixel hinterlegt. Nach der Auswertung und Binarisierung dieser Aufnahmen können verschiedene Parameter zur Charakterisierung des Biofilms berechnet werden. Beispielsweise können das Volumen des Biofilms, die mittlere Biofilmdicke, die Porosität oder die Oberflächenrauheit bestimmt werden. Außerdem kann eine topographische Darstellung der Oberfläche generiert werden. Über diese Parameter kann auch der Einfluss verschiedener Prozessparameter auf den Biofilm beurteilt werden (Wagner und Horn, 2017).

Auch in der mikrobiellen Elektrosynthese ist eine Biofilm-basierte Kultivierung sinnvoll. Durch die Anlagerung von planktonischen Zellen auf der Kathode werden Massentransfer-Limitierungen vermieden, und die Systeme können effizienter arbeiten (Vassilev et al., 2022; Halan et al., 2012). Biofilm-basierte MES-Prozesse sind um mehrere Größenordnungen effizienter als MES-Prozesse, die mit planktonischen Zellkulturen betrieben werden (Flexer und Jourdin, 2020). Die im Medium gelösten Substrate versorgen den Biofilm, indem sie durch die Poren in der Matrix diffundieren.

Zumeist handelt es sich dabei um sogenannte gegenläufige Diffusionsprozesse. Wasserstoff als Elektronenüberträger entsteht unter dem Biofilm an der Kathode und diffundiert an die Oberfläche des Biofilms. Weitere gelöste Substrate, wie Kohlenstoffdioxid oder Sauerstoff, werden über das Kulturmedium bereitgestellt und diffundieren somit von der Biofilm-Flüssig-Grenzfläche an die Biofilmunterseite, zur Kathode.

1.2.4 Anoxische mikrobielle Elektrosynthese

Die anoxische mikrobiellen Elektrosynthese (aMES) fördert das Wachstum von anaeroben Mikroorganismen auf der Kathode. Das können beispielsweise sogenannte acetogene oder methanogene Organismen sein. Diese können unter anderem aus Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff Essigsäure beziehungsweise Methan produzieren. Die Kohlenstofffixierung läuft dabei meist über den bereits beschriebenen Wood-Ljungdahl-Stoffwechselweg oder eine leicht abgewandelten Form davon ab (Ragsdale und Pierce, 2008; Borrel et al., 2016). Die Produktion dieser Wertstoffe findet dabei unter anoxischen Bedingungen statt. Da mit dem Anlegen eines Potentials und der daraus resultierenden Spaltung von Wasser an der Anode jedoch Sauerstoff im System entsteht, müssen Anoden- und Kathodenraum durch eine semipermeable Membran von einander getrennt sein. Diese Membran muss undurchlässig für Sauerstoff, jedoch durchlässig für Protonen sein. Die Protonen werden an der Kathodenseite, zusammen mit den bei der Wasserspaltung frei gewordenen Elektronen, als Energie- und CO_2 als Kohlenstoffquelle zur Produktherstellung verwendet (Rosenbaum et al., 2013). Der Prozess ist in Abbildung 2 dargestellt.

Die Hauptprodukte der anoxischen mikrobiellen Elektrosynthese aus CO_2 sind Acetat und Ethanol (Abdollahi et al., 2022). Mit dem Einsatz spezieller methanogener Archaeen kann auch Methan produziert werden. Dieser Prozess wird Elektromethanogenese genannt (Kracke et al., 2020). Das Produktspektrum der acetogenen Organismen umfasst jedoch auch weitere kurzkettige Fettsäuren und deren dazugehörige Alkohole (Nevin et al., 2011; Ganigué et al., 2015; Vassilev et al., 2018; Dessì et al., 2021). Aufgrund der geringeren Energieausbeute unter Verwendung von CO_2 als Elektronenakzeptor konnten bislang jedoch kaum langkettige und energiereiche Produkte direkt aus CO_2 hergestellt werden. Zur Aufwertung der Produkte können Kettenverlängerungen in darauffolgenden biologischen oder chemischen Umwandlungsschritten erfolgen. Acetat beispielsweise kann durch mikrobiologische Prozesse in längerkettige Carbonsäuren, wie Butyrat oder Caproat, umgewandelt werden. Jedoch hat die Gruppe um Jourdin und Kolleg:innen kürzlich einen aMES-Prozess zur direkten Synthese von Carbonsäuren mit mittlerer Kettenlänge ($\text{C}_4\text{-C}_6$) aus CO_2 entwickelt (Cabau-Peinado et al., 2024). Hierbei konnte unter Einsatz einer mikrobiel-

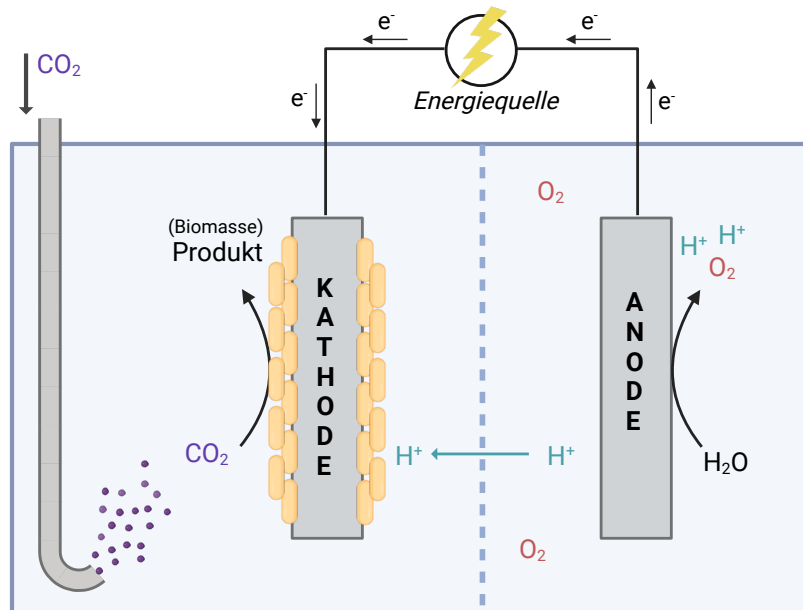


Abbildung 2: Anoxische mikrobielle Elektrosynthese (aMES). Durch Anlegen einer Spannung über eine Energiequelle wird Wasser an der Anode gespalten. Die dabei frei werdenden Elektronen dienen dem produktiven Biofilm auf der Kathodenseite als Energiequelle. Über die Gasphase wird der Biofilm mit gelöstem Kohlendioxid (CO_2) versorgt. Um einen dauerhaft anoxischen Kathodenraum zu gewährleisten, wird eine semipermeable Membran zwischen Anode und Kathode installiert. Der Biofilm an der Kathode reduziert CO_2 zu meist kurzkettingen Endprodukten. Abgewandelt nach Rosenbaum et al. (2013). Die Abbildung wurde mithilfe von Biorender.com erstellt.

len Mischkultur und mithilfe eines innovativen Reaktordesigns eine volumetrische Produktivität von $0,2 \text{ g}_C \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erreicht werden, welche der der effizientesten Synthesegas-Fermentationen im Labormaßstab entspricht. Der industrielle MES-Prozess der Firma LanzaTech zur Produktion von Ethanol aus CO_2 weist derzeit zwar noch eine in etwa fünffach höhere volumetrische Produktivität auf, jedoch haben die entstandenen Endprodukte einen höheren Marktwert, je länger die Kettenlänge ist. Die dominanten Spezies, die in der Mischkultur mutmaßlich für die Kettenverlängerungen verantwortlich waren, waren *Clostridium luticellarii* und *Eubacterium limosum*. Aber auch C_1 - und C_2 -Verbindungen wie Methan oder Ethanol, welche direkt aus der aMES entstehen, können in weiteren Prozessschritten zu längerkettingen Produkten umgewandelt werden. Ethanol kann als Substrat für die Herstellung von Ethylen dienen, welches der Grundbaustein des Kunststoffes Polyethylen ist. Methan kann zusammen mit CO_2 zu Synthesegas reformiert werden (Grootscholten et al., 2013; Joshi et al., 2021; Zhang und Yu, 2013; Kircher und Schwarz, 2020). Auch Anwendungen zur Synthese von Ethanolamin und Glycin aus CO_2 wurden in der Literatur beschrieben (Boto et al., 2023).

Die anoxische mikrobielle Elektrosynthese kann mit einer sehr guten Elektroneneffizienz be-

trieben werden. Die Coulomb'sche Effizienz beschreibt den Anteil der zur Verfügung gestellten Elektronen, der für Produktbildung verwendet wurde. Bei der Produktion von Acetat, Butyrat oder Methan aus CO_2 wurden Coulomb'sche Effizienzen im Bereich von 70 % bis hin zu 100 % erreicht (Fruehauf et al., 2020; Deutzmann und Spormann, 2017; LaBelle und May, 2017; Batlle-Vilanova et al., 2017; Marshall et al., 2012). Die Wertsteigerung von CO_2 kann somit mit einer sehr guten Effizienz betrieben werden. Das bedeutet jedoch zugleich, dass wenig bis gar keine Elektronen für die Bildung von Biomasse zur Verfügung stehen. Mikrobielle Biomasse kann hohe Proteingehalte von bis zu 75 % erreichen und ist damit ein attraktives Produkt, insbesondere in der Lebensmittelindustrie (Mishra et al., 2020; Sillman et al., 2019; Sharif et al., 2021). Das Spektrum der möglichen Endprodukte ist aufgrund der geringeren Energieverfügbarkeit begrenzt. Bei der Verwendung von Mischkulturen zur Produktion von Carbonsäuren mit mittlerer Kettenlänge ist zu beachten, dass dabei stets die methanogenen Organismen unterdrückt werden müssen, um die Ausbeute zu erhöhen, was momentan nur durch die Zugabe teurer Chemikalien möglich ist (Cabau-Peinado et al., 2024). Gentechnische Veränderungen des Stoffwechsels zur Erweiterung des Produktspektrums sind herausfordernd (Salehizadeh et al., 2020; Jajesniak et al., 2014). Methan als Produkt der mikrobiellen Elektrosynthese ist nur selten wirtschaftlich kompetitiv, da Methan in Biogasanlagen sehr günstig hergestellt werden kann. Zuletzt wirft der strikt anaerobe Metabolismus der Mikroorganismen einige prozesstechnische Herausforderungen auf. Wie bereits erwähnt, muss der Anodenraum vom Kathodenraum durch eine semipermeable Membran getrennt sein. Diese erhöht die Komplexität des Prozesses und steigert ebenso die Prozesskosten. Der interne Widerstand eines bioelektrochemischen Systems wird durch Installation einer Membran erhöht, wodurch auch der Energiebedarf des Systems steigt. Auch der Betrieb eines anoxischen Prozesses im industriellen Maßstab stellt eine Herausforderung dar, nicht zuletzt, da die meisten CO_2 -reichen industriellen Abgase auch Sauerstoff enthalten (Porter et al., 2015). Im Gegensatz zur anoxischen MES soll deshalb nun die oxische MES betrachtet werden.

1.2.5 Oxische mikrobielle Elektrosynthese

Im Gegensatz zur anoxischen MES läuft die oxische mikrobielle Elektrosynthese (oMES) nicht unter Sauerstoffausschluss ab. Obwohl die erste oMES bereits 1965 in der Literatur beschrieben wurde (Schlegel und Lafferty, 1965), existieren bis heute nur wenige Prozesse, welche die mikrobielle Elektrosynthese unter oxischen Bedingungen betreiben (Reiner et al., 2024). Hierbei dient ebenfalls CO_2 als Kohlenstoffquelle und Wasserstoff als Energie- und Elektronenquelle. Statt CO_2 wird in der oMES jedoch Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor verwendet. Da der aus

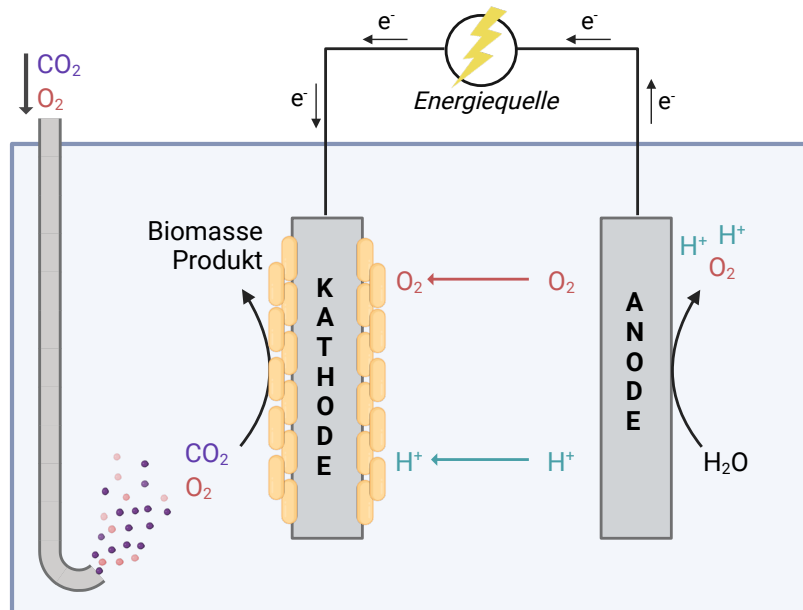


Abbildung 3: Oxische mikrobielle Elektrosynthese (oMES). Durch Anlegen einer Spannung über eine Energiequelle wird Wasser an der Anode gespalten. Die dabei frei werdenen Elektronen dienen dem produktiven Biofilm auf der Kathodenseite als Energiequelle. Über die Gasphase wird der Biofilm mit gelöstem Kohlendioxid (CO_2) und Sauerstoff (O_2) versorgt. Der Biofilm an der Kathode reduziert CO_2 . Dabei entstehen zum einen Biomasse, aber auch länger-kettige mikrobielle Produkte. Abgewandelt nach Reiner et al. (2024). Die Abbildung wurde mithilfe von Biorender.com erstellt.

der Spaltung von Wasser entstehende Sauerstoff metabolisch nicht ausreicht, wird meist weiterer Sauerstoff über die Gasphase zur Verfügung gestellt (Rominger et al., 2024). Das Prinzip ist in Abbildung 3 dargestellt.

Die Mikroorganismen, welche bei der oMES zum Einsatz kommen, werden Knallgasbakterien genannt. Diese sind ebenfalls autotroph, wobei sie durch die Oxidation von Wasserstoff Energie gewinnen. Jedoch nutzen Knallgasbakterien Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor. Da Sauerstoff im Vergleich zu CO_2 ein höheres Redoxpotential hat, steht den Organismen insgesamt mehr Energie zur Verfügung. Die CO_2 -Fixierung läuft meist über den CBB-Zyklus (s. Kapitel 1.1.2) ab. Unter den sechs in der Literatur bekannten Stoffwechselwegen zur CO_2 -Fixierung sind drei sauerstofftolerant (Berg et al., 2010). Neben dem Hydroxypropionat-Hydroxybutyrat-Zyklus und dem Dicarboxylat-4-Hydroxybutyrat-Zyklus ist der CBB-Zyklus unter diesen der in der Natur relevanteste. Es handelt sich bei dem CBB-Zyklus um eine assimilative CO_2 -Fixierung. Ein Großteil des fixierten Kohlendioxids wird in der Biomasse und intrazellulären Speicherstoffen gebunden (Reiner et al., 2024). Zusammen erlauben die Verfügbarkeit von mehr Energie und die CO_2 -Fixierung über den CBB-Zyklus die Synthese von länger-kettigen und komplexeren Endprodukten (Schmidt-Rohr, 2020). Ein Modellorganismus unter den Knallgasbakterien

ist *Cupriavidus necator*. Der Wildtyp kann, auch unter elektroautotrophen Wachstumsbedingungen, das Speicherpolymer Polyhydroxybuttersäure herstellen (Langsdorf et al., 2024). Mit anderen Organismen wurde auch die Produktion von mikrobiellem Protein aus Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff bereits untersucht (Mishra et al., 2020; Rominger et al., 2024).

Unter oxischen Bedingungen geht das Schlüsselenzym des CBB-Zyklus, die RuBisCO, jedoch eine Nebenaktivität als Oxygenase ein. Dies macht den CBB-Zyklus zu einem energetisch sehr ineffizienten Weg zur Fixierung von CO₂. Auch für die mikrobielle Energiegewinnung bedarf es eines Anteils der zur Verfügung gestellten Elektronen. Dabei werden die Elektronen durch eine Atmungskette geleitet, was zur Synthese des Energieträgers ATP führt. Insgesamt wird also nur ein kleiner Anteil der aufgenommenen Elektronen überhaupt für die Reduktion und Fixierung von CO₂ verwendet. Für das Knallgasbakterium *Kyrpidia spormannii* liegt dieser Anteil bei etwa 28 % (Rominger et al., 2024).

Die Sauerstoffkonzentration spielt eine kritische Rolle bei der Kultivierung von Knallgasbakterien. Wie bereits zuvor diskutiert, liefert die Verwendung von Sauerstoff als terminalem Elektronenakzeptor die für den Biomasse-Aufwuchs notwendige Energie. Unter Sauerstofflimitierung kann also kein maximales Biomassewachstum stattfinden. Zugleich nutzen aber die Knallgasbakterien Wasserstoff als Elektronen- und Energiequelle. Dieser wird durch membrangebundene Hydrogenasen oxidiert und die entstandenen Elektronen werden anschließend in die zelluläre Atmungskette aufgenommen. Die Hydrogenasen sind teilweise sensitiv und häufig komplett intolerant gegenüber Sauerstoff. Selbst die in Knallgasbakterien vorkommenden, sauerstofftoleranten Hydrogenasen werden ab bestimmten Sauerstoffkonzentrationen inhibiert (Cracknell et al., 2009; Lenz et al., 2010). Es gibt daher einen Bereich der optimalen Sauerstoffkonzentration, in welchem weder das Biomassewachstum limitiert wird noch die Wasserstoffoxidation durch die Hydrogenasen inhibiert wird. Neben der biologischen Betrachtung spielt Sauerstoff jedoch auch eine wichtige Rolle für die Prozesseffizienz. Wenn Sauerstoffmoleküle in Kontakt mit der Kathode kommen, kann es zur abiotischen Reduktion kommen. Nicht nur kommt es so zu Elektronenverlusten und somit zu einer geringeren Coulomb'schen Effizienz des Prozesses, es können dabei neben Wasser auch für die Mikroorganismen potentiell schädliche Reduktionsprodukte entstehen, die reaktiven Sauerstoffspezies (engl. Reactive Oxygen Species, ROS). Ein Beispiel ist die Reduktion von Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid (H₂O₂). Eine erhöhte H₂O₂-Konzentration an der Kathode kann das Biofilmwachstum inhibieren.

Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass die oxische mikrobielle Elektrosynthese noch vor einigen Herausforderungen steht, bevor es zum großtechnischen Einsatz kommen kann. Die Systeme

sind bisher weniger weit entwickelt als Systeme zur anoxischen mikrobiellen Elektrosynthese. Prozesse befinden sich häufig noch in der Entwicklung. Es sind erst wenige Knallgasbakterien mit begrenztem Produktspektrum im Einsatz. Die Prozesse können aus verschiedenen bereits erwähnten Gründen energetisch ineffizient sein. Hier fehlt es häufig an experimentellen Daten zur Bestimmung der Energieeffizienz eines solchen Prozesses. Zudem fehlen Werkzeuge für die Vorhersage des Sauerstoffbedarfs des Systems. Zum besseren Verständnis und als Grundlage für eine Hochskalierung wurde deshalb in dieser Arbeit ein oMES-Prozess entwickelt, aufgebaut und untersucht.

1.3 Zielsetzung

Der in dieser Arbeit entwickelte Prozess betreibt oxische mikrobielle Elektrosynthese mit dem Knallgasbakterium *Kyrpidia spormannii*. Es konnten mit der Entwicklung des Prozesses einige generelle Herausforderungen von Prozessen der mikrobiellen Elektrosynthese angegangen und teilweise gelöst werden. Das Wachstum von *K. spormannii* ist thermo- und acidophil. Die Kultivierung bei 60 °C und einem pH-Wert von 3,5 erleichtert die Prozessführung im Hinblick auf mögliche Kontaminationen. Mit der mikrobiellen Elektrosynthese konnte zudem im Vergleich zur konventionellen Gasfermentation mit Sauerstoff und Wasserstoff die Problematik der Bildung eines explosiven Gasgemisches vermieden werden.

Wie bereits zuvor beschrieben, bietet die Verwendung aerober Mikroorganismen in der MES ein breiteres Produktspektrum als bei der anoxischen Fermentation. In dieser Arbeit sollten erste Möglichkeiten untersucht werden, mikrobielle Primärmetabolite wie Einzelzellprotein oder intrazelluläre Speicherpolymere zu produzieren.

Prozesse zur anoxischen mikrobiellen Elektrosynthese wurden in der Literatur hinreichend bezüglich ihrer Elektroneneffizienz charakterisiert (Fruehauf et al., 2020; Deutzmann und Spormann, 2017; LaBelle und May, 2017; Batlle-Vilanova et al., 2017; Marshall et al., 2012). Die oxische MES stellt im Gegensatz dazu eine so neue Technologie dar, dass in der Literatur noch kaum Daten zur Energieeffizienz vorliegen. Eine Herausforderung dabei ist die Quantifizierung der Biomasse, welche das primäre Produkt der oMES darstellt. Hierfür wurde in dieser Arbeit eine Kultivierungsplattform verwendet, welche die Quantifizierung über optische Kohärenztomographie erlaubt. So sollte zum einen die Coulomb'sche Effizienz und zum anderen der Energiebedarf für die Produktion der Biomasse bestimmt werden. Eine weitere Herausforderung bei der oxi-

schen mikrobiellen Elektrosynthese stellt die abiotische Sauerstoffreduktion an der Kathode dar. Nicht nur verringert diese die Elektroneneffizienz, es können auch reduktive Sauerstoffspezies entstehen, die das Wachstum des Biofilms auf der Elektrode inhibieren können. Deshalb sollte zunächst über eine Modellierung des Prozesses in COMSOL Multiphysics die optimale Sauerstoffkonzentration ermittelt werden, welche ausreichen sollte, den Biofilm mit Sauerstoff zu versorgen, jedoch keinen großen Sauerstoffüberschuss erlaubt, welcher an der Kathode reduziert werden kann. Des Weiteren sollte eine Prozessführungsstrategie entwickelt werden, welche es erlaubt, den Prozess kontinuierlich zu betreiben. Dafür musste zunächst eine Methode etabliert werden, den Biofilm von der Arbeitselektrode zu ernten. Dabei sollte darauf geachtet werden, so wenig freie Kathodenoberfläche wie möglich zu generieren, um die abiotische Sauerstoffreduktion zu minimieren. Daneben sollte für einen kontinuierlichen Betrieb zudem gezeigt werden, dass ein teilweise geernteter Biofilm in der Lage ist, sich zu regenerieren.

Die langsame initiale Phase der Biofilmentwicklung verlängert die Anlaufzeit und damit die unproduktive Phase des Prozesses. Über Zugabe eines funktionalisierten Polymers sollte untersucht werden, ob es möglich ist, die Anlaufzeit des Prozesses zu verkürzen und damit den Prozess zu beschleunigen.

Zuletzt sollte der Prozess im Hinblick auf einen möglichen Anwendungsfall getestet werden. Hierfür sollte Rauchgas aus der Abfallverbrennung als Kohlenstoffquelle für *K. spormannii* verwendet werden. Es sollte zum einen die generelle Kompatibilität der Mikroorganismen mit dem realen Rauchgas gezeigt werden, aber auch, dass eine mikrobielle Elektrosynthese unter diesen Bedingungen möglich ist.

2 Material und Methoden

2.1 Ressourcen

2.1.1 Mikroorganismen und Kultivierungsbedingungen

Für alle Experimente in dieser Arbeit wurde ein auf elektroautotrophes Wachstum adaptierter Stamm von *Kyrpidia spormannii* EA-1 verwendet (Jung et al., 2021).

Die heterotrophen Kultivierungen wurden bei 60 °C und pH 6 in R2A-Medium durchgeführt, wobei die Zusammensetzung des R2A Mediums nach Reasoner und Geldreich (1985) leicht angepasst wurde (Tabelle 1).

Tabelle 1: Zusammensetzung des RR2A-Mediums. Der pH-Wert wurde mit 1 M H₂SO₄ auf 6 eingestellt.

Komponente	Konzentration
Hefeextrakt	5 g L ⁻¹
Pepton	1 g L ⁻¹
Natriumpyruvat	1 g L ⁻¹
Caseinhydrolysat	0,5 g L ⁻¹
Lösliche Stärke	0,5 g L ⁻¹
Dikaliumhydrogenphosphat	0,1 g L ⁻¹
MOPS-Puffer	10 mM

Für autotrophes und elektroautotrophes Wachstum wurden die Zellen bei 60 °C und pH 3,5 in ES-Medium kultiviert (Tabelle 2). Als Kohlenstoffquelle diente in beiden Fällen CO₂. Als Energiequelle wurde in den autotrophen Ansätzen Wasserstoff verwendet. Bei Verwendung heterotroph gewachsener Vorkulturen für autotrophe Experimente wurden diese zweimal in ES-Medium für 10 min bei 6000 ×g gewaschen.

Tabelle 2: Zusammensetzung des ES-Mediums. Der pH-Wert lag zwischen 3,5 und 4; die Zusammensetzung des Wolfe's mineral elixir ist in Tab. 3 gezeigt.

Komponente	Konzentration
Ammoniumchlorid	0,53 g L ⁻¹
Natriumchlorid	0,15 g L ⁻¹
Kaliumdihydrogenphosphat	0,04 g L ⁻¹
Calciumchlorid (0,1 M)	1 mL L ⁻¹
Magnesiumsulfat (1 M)	0,12 mL L ⁻¹
Wolfe's mineral elixir	1 mL L ⁻¹

Tabelle 3: Zusammensetzung des Wolfe’s mineral elixir. Der pH-Wert wurde mit konzentrierter Schwefelsäure auf 1 eingestellt.

Komponente	Konzentration
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	30 g L ⁻¹
Mangansulfat-Monohydrat	5 g L ⁻¹
Natriumchlorid	10 g L ⁻¹
Eisensulfat-Heptahydrat	1 g L ⁻¹
Cobaltchlorid-Hexahydrat	1,8 g L ⁻¹
Calciumchlorid-Dihydrat	1 g L ⁻¹
Zinksulfat-Monohydrat	1,8 g L ⁻¹
Kupfersulfat-Pentahydrat	0,1 g L ⁻¹
Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat	0,18 g L ⁻¹
Borsäure	0,1 g L ⁻¹
Natriummolybdat-Dihydrat	0,1 g L ⁻¹
Ammonium-Nickelsulfat-Hexahydrat	2,8 g L ⁻¹
Natriumwolframat-Dihydrat	0,1 g L ⁻¹
Natriumselenat	0,1 g L ⁻¹

2.1.2 Verwendete Chemikalien und Gase

Sofern nicht anderweitig erwähnt, wurden sämtliche verwendete Chemikalien in dieser Arbeit von den Firmen Roth (Karlsruhe, DE), VWR Chemicals (Darmstadt, DE), Sigma-Aldrich (München, DE), Merck (Darmstadt, DE) und Fisher Scientific (Schwerte, DE) bezogen. Die verwendeten Gase und Gasmischungen wurden bei Westfalen (Münster, DE) und HOWE Sauerstoffwerk (Steinfurt, DE) bezogen.

2.2 Knallgas-basierte Studien zum autotrophen Metabolismus

Studien zum autotrophen Metabolismus von *K. spormannii* wurden in gasdichten Batch-Ansätzen durchgeführt. Es wurden sowohl ein biotisches Triplikat als auch eine abiotische Kontrolle im Triplikat untersucht. Alle Ansätze wurden mit der gleichen Gasmischung begast. Anhand der Differenz in der Stoffmenge zwischen Beginn und Ende der Kultivierung wurde der Gasverbrauch bestimmt. Als Gasphase wurde eine Gasmischung mit einer Zusammensetzung von 70 % Wasserstoff (H₂), 20 % Kohlenstoffdioxid (CO₂) und 10 % Sauerstoff (O₂) verwendet. Die Mischung wurde mithilfe von drei Gas-Massenflussreglern (engl. Mass Flow Controllers, MFCs) (Bronkhorst, NL) erstellt und zunächst in Gasbeuteln aufgefangen. Um Gasdichtigkeit zu erreichen, wurden Schottflaschen mit einem Gesamtvolumen von 5500 mL mit einem Gummistopfen verschlossen. Das Kulturvolumen wurde auf 500 mL begrenzt, sodass ein sehr hohes Gas-zu-Flüssigkeit-Verhältnis

von ca. 11:1 erreicht werden konnte. Die biotischen Ansätze wurden auf eine optische Dichte (OD_{600}) von 0,05 angeimpft. Anschließend wurde das Gasvolumen bei allen Flaschen zunächst durch Stickstoff ersetzt und dann durch Anlegen eines Vakuums entfernt. Durch Anschließen der Gasbeutel wurde die Gasmischung in den Kopfraum der Flaschen gesaugt. Um ein Löslichkeitsgleichgewicht herzustellen, wurden die Flaschen daraufhin bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer Stunde wurde mithilfe einer Spritze eine Probe der Gasphase entnommen (ca. 50 mL) und deren Zusammensetzung mithilfe einer Gaschromatographie bestimmt.

Für die Untersuchung von Gaszusammensetzungen wurde der 490 MikroGC (Agilent Technologies, Waldbronn, DE) verwendet. Dieser Gaschromatograph ist mit zwei Säulen ausgestattet. Die Vorsäule war eine PPQ-Säule, auf welcher Kohlenstoffdioxid quantifiziert werden konnte. Die Säule hatte eine Länge von 10 m und wurde mit Helium als Trägergas betrieben. Für die Messung wurde die Säulentemperatur auf 45 °C eingestellt, der initiale Druck auf 150 kPa. Die Quantifizierung von Wasserstoff, Sauerstoff, Stickstoff und Methan erfolgte auf der Hauptsäule, einer Molsieb 5A-Säule. Auch diese hatte eine Gesamtlänge von 10 m, als Trägergas diente hier jedoch Argon. Die Säule wurde bei einer Temperatur von 70 °C und ebenfalls einem Druck von 150 kPa betrieben. Die Messmethode beinhaltete zunächst eine Stabilisierungsphase von 5 s. Es folgte die Probenahme von 20 s und die Injektion auf die erste Säule, welche 50 ms dauerte. Die Temperatur des Injektors lag bei 110 °C. Die Backflush-Zeit an der PPQ-Säule wurde auf 5 s eingestellt, bei der Molsieb-Säule betrug sie 7,5 s. Die anschließende Messung dauerte 180 s. Die Detektion der Gaskomponenten erfolgte mit einem TCD-Detektor (Agilent Technologies, Waldbronn, DE). Die Auswertung der Signale erfolgte mit der Software Agilent OpenLAB EZChrom. Die Flaschen wurden nun auf dem Kopf bei 60 °C inkubiert, bis die OD auf 0,1 oder mehr angestiegen war. Der durch Probenahme und mikrobiellen Verbrauch entstandene Unterdruck in den Flaschen wurde mit Stickstoff auf Umgebungsdruck ausgeglichen. Wie zu Beginn wurden die Flaschen eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um ein Löslichkeitsgleichgewicht herzustellen. Die Konzentrationen der einzelnen Gaskomponenten c_i wurden erneut auf der MikroGC bestimmt.

Um die Differenz der Stoffmenge der einzelnen Gaskomponenten n_i zwischen Beginn und Ende der Kultivierung zu bestimmen, wurde zunächst die Gesamtstoffmenge n_{gesamt} des Kopfraumes der Flasche bestimmt. Unter Annahme eines idealen Gasverhaltens konnte diese über die Gleichung 2.1 bestimmt werden (Stadlmayr, 2018). Hierbei beschreibt p den Druck, V das Volumen, R die

ideale Gaskonstante und T die Temperatur.

$$n_{gesamt} = \frac{p * V}{R * T} \quad [\text{mol}] \quad (2.1)$$

Die Stoffmenge einer Gaskomponente i kann nun aus der Zusammensetzung bestimmt werden (Gleichung 2.2):

$$n_i = n_{gesamt} * c_i \quad [\text{mol}] \quad (2.2)$$

In jeder Flasche traten abiotische Gasverluste auf. Diese waren aus der abiotischen Kontrolle bekannt und wurden von der Gesamtdifferenz abgezogen. So konnte der mikrobielle Verbrauch von H₂, CO₂ und O₂ berechnet werden.

Für die Simulation eines Realbetriebs mit industriellem Rauchgas als Substrat wurde *K. spor-mannii* ähnlich zu den zuvor beschriebenen Studien in gasdichten Batch-Ansätzen kultiviert. Statt synthetischem Knallgas wurde jedoch reales Rauchgas aus drei verschiedenen industriellen Müllverbrennungsanlagen entnommen und verwendet (Stapelfeld, Großräschen und Delfzijl - Energy from Waste GmbH, EEW). Die genaue Zusammensetzung unterliegt der Geheimhaltung, es kann jedoch angegeben werden, dass sich die Gase zu ca. 10 % aus Sauerstoff und 13 % aus Kohlenstoffdioxid zusammensetzten. Der Rest bestand größtenteils aus Stickstoff. Um den Sauerstoffgehalt zu reduzieren, wurden die Gase im Volumenverhältnis 1:2 mit einer Gasmischung bestehend aus 80 vol-% Stickstoff und 20 vol-% Kohlenstoffdioxid verdünnt. Die finale Zusammensetzung des Rauchgases betrug dann etwa 16,5 % CO₂ und 5 % O₂, der Rest bestand größtenteils aus Stickstoff. Die gasdichten Flaschen wurden wie oben beschrieben zunächst vakuumisiert, um dann mit der Gasmischung befüllt zu werden. Als Energiequelle diente Wasserstoff. Die Flaschen wurden mit diesem auf einen Überdruck von 1 bar begast. Die weitere Kultivierung erfolgte in Duplikaten und wie bereits zuvor beschrieben.

2.3 Bioelektrochemische Kultivierung

2.3.1 Elektrochemische Methoden

In dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden zur Analyse elektrochemischer Reaktionen betrachtet. Bei einer Linear-Sweep-Voltammetrie (LSV) wird das Potential an der Arbeitselektrode innerhalb eines zuvor definierten Potentialbereichs mit einer definierten Rate variiert. Der dabei entstehende Stromfluss wird vom Potentiostaten aufgezeichnet. Bei einer Cyclovoltammetrie (CV) wird das Potential wie bei einer LSV in einem definierten Bereich variiert, allerdings nicht nur in eine Richtung, sondern sowohl aufwärts als auch abwärts. Die Reihenfolge der Richtung, sowie die Anzahl an Wiederholungen der Zyklen kann hier frei gewählt werden. Die Sweep-Methoden werden oftmals verwendet, um bestimmte Reaktionspotentiale in einem System zu finden. Im Gegensatz dazu wird das Potential bei der Chronoamperometrie (CA) konstant gehalten. Der Potentiostat zeichnet den resultierenden Stromfluss auf (Bard und Faulkner, 2001). Das Messintervall bei chronoamperometrischen Messungen in dieser Arbeit lag bei 120 s. Die Kompensation des internen Widerstands zwischen Arbeits- und Referenzelektrode war aktiviert. Es wurden ausschließlich Potentiostaten der Firma Gamry Instruments (Modell Interface 1000B, Gamry Instruments, Warminster, USA) verwendet. Das Potential wurde gegen eine Silber-Silberchlorid-Referenzelektrode (Ag/AgCl) eingestellt. Für eine bessere Vergleichbarkeit zu anderen Studien werden die Werte jedoch im Folgenden immer auf eine Standard-Wasserstoff-Elektrode (SHE) referenziert werden. Hierbei entsprechen $-0,199\text{ V vs. Ag/AgCl}$ folglich 0 V vs. SHE .

2.3.2 Aufbau der Fließzellen-Peripherie

Jede elektroautotrophe Kultivierung von Biofilmen in dieser Arbeit wurde in einem kontinuierlich durchströmten Fed-Batch-Setup durchgeführt. Diese Fließzellen-Peripherie wurde entwickelt, um optimale Kultivierungsbedingungen zu gewährleisten (Hackbarth et al., 2020). Einen Überblick über das System bietet Abb. 4. Die Abbildung wurde leicht abgewandelt aus Hackbarth et al. (2020) übernommen.

Über die Durchströmung des Doppelmantels des Medienbehälters wurde die Temperatur im Reaktor mithilfe eines Heiz- und Kühl-Umwälzthermostats (VWR International, Radnor, USA) reguliert. Der pH-Wert wurde im Medienbehälter gemessen, jedoch nicht aktiv kontrolliert. Im Medienbehälter wurde das Medium auch temperiert und begast. Mithilfe eines Magnetrührers wurde das Medium durchmischt. Die im Medium gelösten Gase wurden über eine Magnetzahn-

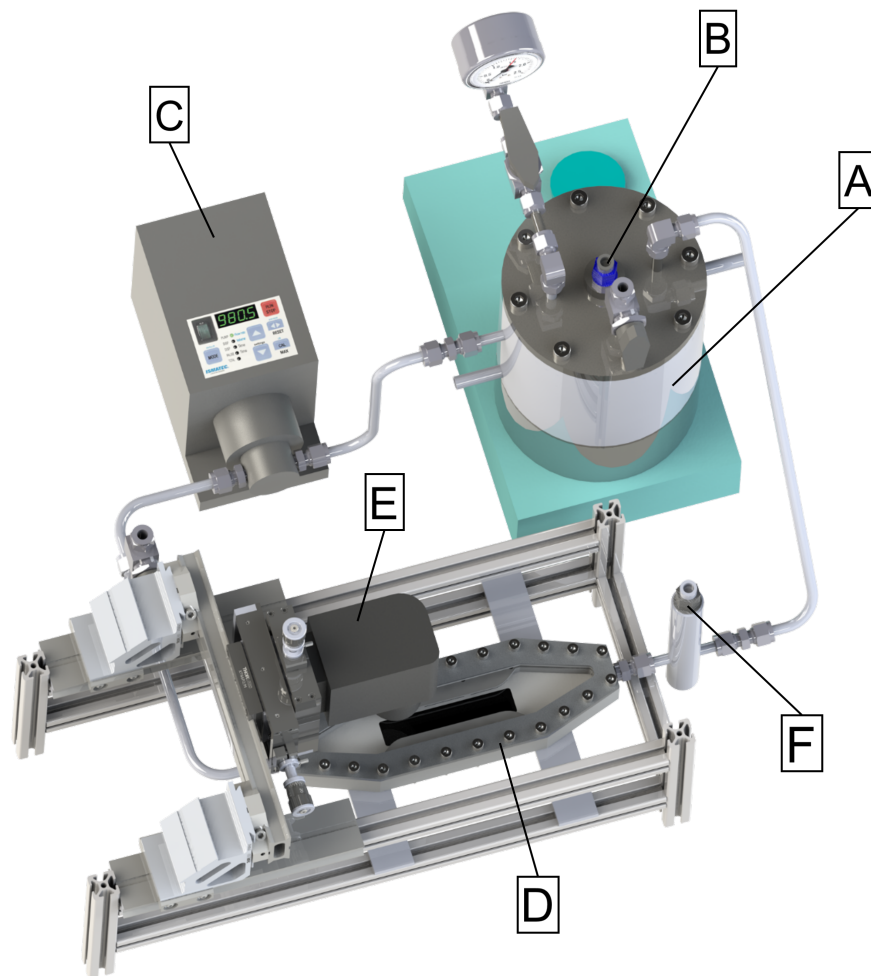


Abbildung 4: Aufbau der Fließzellen-Peripherie. **A** - Medienbehälter (doppelwandig); **B** - pH-Elektrode; **C** - Magnetzahnradpumpe; **D** - Fließzelle; **E** - OCT-System samt Halterung; **F** - Referenzelektrode; mit Genehmigung aus (Hackbarth et al., 2020) übernommen.

radpumpe (ISMATEC REGLO-Z Digital, Cole-Parmer, Wertheim, DE) in die eigentliche Fließzelle transportiert. Die Verrohrung sowie der doppelwandige Medienbehälter wurden aus V4A-Edelstahl gefertigt, der Körper der Fließzelle bestand aus Polyether-Ether-Keton (PEEK). Das bioelektrochemische System wurde als Drei-Elektroden-Setup betrieben. Die Arbeitselektrode bestand aus einer Graphit-Platte (MR40, Müller und Rössner, Troisdorf-Bergheim, DE) in der Größe von $20\text{ mm} \times 100\text{ mm}$. Sie wurde durch Rezirkulation des Mediums im System kontinuierlich überströmt. Die sechs Gegenelektroden lagen der Arbeitselektrode gegenüber, wobei die Kontaktflächen zueinander wiesen. Sie bestanden aus Iridium-Tantal-beschichtetem Titan (PlatinodeTM - MMO Anode 177, umicore, Schwäbisch Gmünd, DE). Ihre Gesamtfläche betrug ebenfalls 20 cm^2 . Von außen wurden die Arbeitselektrode und die Gegenelektroden mit Titan-Schrauben konnektiert. Die Silber-Silberchlorid-Referenzelektrode (SE23I, Sensortechnik Meinsberg, Waldheim, DE) war in Fließrichtung hinter der Fließzelle angebracht. Mithilfe eines Po-

tentiostaten wurden kontrollierte elektrochemische Bedingungen eingestellt sowie die Messwerte aufgezeichnet. Die Fließzelle wurde von einer Polycarbonat-Scheibe von 5 mm Dicke abgedeckt. Diese wurde über einen Rahmen aus Edelstahl am Körper der Fließzelle befestigt und abgedichtet. Durch die Scheibe konnte der Biofilmaufwuchs auf der Arbeitselektrode über optische Kohärenztomographie (OCT) überwacht und quantifiziert werden (Kapitel 2.3.5).

2.3.3 Betrieb eines Biofilm-basierten elektroautotrophen Kultivierungsprozesses

Der Prozess wurde bei 60 °C und pH 3,5 - 4 betrieben. Um eine definierte Gelöstsauerstoffkonzentration einzustellen, die an den Bedarf der Mikroorganismen angepasst war (siehe Kapitel 2.3.6), wurde die Gasphase durch Begasung mit dem Gasmischer und anschließender Bedruckung mit CO₂ auf die gewünschte Zusammensetzung gebracht. Der Kopfraum wurde auf 1,5 bar Überdruck bedruckt. Das Medium wurde mit einer Fließgeschwindigkeit von 100 mL min⁻¹ rezirkuliert. Vor Beginn eines Experiments wurde das ES-Medium (Tabelle 2) anaerobisiert, um den gelösten Sauerstoff zu entfernen. Nur so konnte anschließend eine definierte Gelöstsauerstoff-Konzentration eingestellt werden. Jedes Experiment wurde zunächst abiotisch gestartet. Dies diente dazu, stabile elektrochemische Bedingungen herzustellen, bevor nach einem Tag die Inokulierung erfolgte. In allen Experimenten in dieser Arbeit wurde ein definiertes Potential an der Arbeitselektrode angelegt, sie wurden also chronoamperometrisch betrieben. Sofern nicht anders erwähnt, wurde das Medium im Reaktor durch abiotisches, anoxisches Medium ersetzt, sobald mittels OCT eine vollständige Bedeckung der Arbeitselektrode mit Biofilm festgestellt wurde. So konnte sichergestellt werden, dass die beobachtete Änderung des Biovolumens (s. Kapitel 2.3.5) tatsächliches Wachstum war und keine Sedimentation planktonischer Zellen. Sobald das Volumen des Biofilms einen stationären Wert erreichte, wurde die Wachstumsphase beendet. Um den Biofilm zu ernten, wurde ein Potential von -2,8 V vs. SHE für zwei Minuten angelegt. Die dabei entstehenden Wasserstoffblasen lösten den Biofilm teilweise ab. Sollte danach noch der Wiederaufwuchs des Biofilms im selben System untersucht werden, wurden die abgelösten Teile des Biofilms zuvor aus dem Medium entfernt.

Die Gaszusammensetzung des realen Rauchgases aus industriellen Müllverbrennungsanlagen (EEW) unterschied sich von den zuvor im bioelektrochemischen System verwendeten synthetischen Mischungen. Um zu demonstrieren, dass eine elektroautotrophe Kultivierung auch mit einer solchen Gaszusammensetzung möglich ist, wurde ergänzend zu den zuvor beschriebenen Experimenten eine synthetische Gasmischung verwendet, die an die Zusammensetzung des Rauchgases angelehnt war. Das Gas setzte sich aus 8,2 % Sauerstoff, 10,7 % Kohlenstoffdioxid und 81,1 %

Stickstoff zusammen. Das Experiment wurde bei -500 mV vs. SHE durchgeführt. Die weiteren Prozessparameter blieben unverändert.

2.3.4 Bestimmung der Gelöstsauerstoff-Konzentration

Um die Konzentration des im Medium gelösten Sauerstoffs in den Fließzellen zu bestimmen, wurde eine optische Methode verwendet. Das Messprinzip basiert auf Anregung eines Indikators, welcher auf dem Sensor immobilisiert ist. Der Indikator wird mit rotem Licht bei einer Wellenlänge von 610 - 630 nm angeregt. Die Lumineszenz-Antwort des Indikators im nahen Infrarot-Bereich ist abhängig von der Sauerstoffkonzentration und wird von einem Detektor aufgezeichnet. Als Sensor wurden selbstklebende Spots mit einem Durchmesser von 5 mm verwendet, welche an der Innenseite der Polycarbonat-Scheibe in der Fließzelle befestigt wurden (OXSP5-ADH; Pyroscience, Aachen, DE). Von außen wurden definierte Lichtimpulse auf den Sensor gesendet und die entsprechende Signalantwort detektiert. Der Sensor penetriert das System nicht und ist somit nicht invasiv. Zudem wird bei der Messung kein Sauerstoff verbraucht. In dieser Arbeit wurde die Sauerstoffkonzentration in den Fließzellen mehrmals täglich überprüft, jedoch nicht kontinuierlich aufgezeichnet.

2.3.5 Optische Kohärenztomographie und Parameter zur Beschreibung des Biofilmwachstums

Als Methode zur Visualisierung und Quantifizierung des Biofilms in den Fließzellen wurde die optische Kohärenztomographie (OCT, siehe Kapitel 1.2.3) gewählt. Es wurde mit einem Ganymede-Gerät (GAN200) der Firma Thorlabs (Dachau, DE), ausgestattet mit einer LSM-03-Linse, gearbeitet. Der Brechungsindex wurde mit 1,33 auf den von Wasser eingestellt. Für alle Aufnahmen wurde eine Voxel-Größe von $4 \mu\text{m} \times 4 \mu\text{m} \times 2,15 \mu\text{m}$ gewählt. Dies erleichterte die spätere mathematische Auswertung. Ein Voxel ist ein kubisches Pixel. Es wurde stets eine Fläche von $6 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}$ aufgenommen. Um die Datengröße zu reduzieren, waren die Bilder in z-Richtung meist 1 mm tief, es sei denn, der Biofilm war zu hoch gewachsen, sodass der Bildrahmen erweitert werden musste. Die Aufnahmegeschwindigkeit betrug 36 kHz, und für die Berechnung der Tiefenprofile wurde die Methode LightSourceBased gewählt.

Die Fließgeschwindigkeit des Mediums ist über die Länge der Arbeitselektrode nicht konstant und hat dadurch einen Einfluss auf die Morphologie des Biofilms (Hackbarth et al., 2020). Deshalb wurden die Aufnahmen stets an den gleichen Positionen in der Fließzelle gemacht. Diese liegen jeweils am Anfang, in der Mitte oder am Ende des Strömungskanal und wurden von Hack-

barth et al. (2020) bereits beschrieben. Der OCT-Kopf konnte dank einer stabilen Halterung reproduzierbar über den zu überwachenden Positionen angebracht werden. Da die Strömungsgeschwindigkeit in Strömungsrichtung abnimmt und somit die Scherkraft auf den Biofilm, nimmt die Dicke des Biofilms am hinteren Ende des Strömungskanals schneller zu. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass das Wachstumsverhalten an der mittleren Position die allgemeine Wachstumstendenz gut repräsentiert (s. Abb A1 im Anhang), weshalb zur besseren Vergleichbarkeit in der folgenden Arbeit die Aufnahmen des Biofilms immer an der mittleren Position erfolgten, sofern nicht anderweitig erklärt.

Die Auswertung der OCT-Aufnahmen erfolgte wie beschrieben nach Wagner und Horn (2017). Für die Auswertung wurde das Programm ImageJ verwendet (Schindelin et al., 2012). Zunächst wurden die Aufnahmen binarisiert. Die Speicherung der Aufnahmen erfolgte im Dateiformat *.oct*, welches in einem ersten Schritt in das Dateiformat *.tif* umgewandelt wurde. Um die Aufnahmen an die Auflösung der verwendeten Monitore anzupassen, wurden sie im nächsten Schritt von 32 bit auf 8 bit komprimiert. Nach Anwenden eines Median-Filters (Radius 1) wurden die einzelnen Aufnahmen so zurechtgeschnitten, dass mögliche Interferenzen am Bildrand die Auswertung nicht mehr beeinflussen konnten. Anschließend wurde der Kontrast automatisch angepasst, bevor das Makro *untilt* ausgeführt wurde. Dieses suchte bei jedem einzelnen A-Scan in einer Aufnahme nach einem Voxel mit einer zuvor definierten Helligkeit. Diese Helligkeit beschrieb den Beginn der Arbeitselektrode und wurde durch einen Schwellenwert definiert. Alle Signale, die sich unter der Arbeitselektrode befanden, zuzüglich der Dicke der Elektrode, wurden vom Programm abgeschnitten, sodass die Elektrodenoberfläche nun die untere Grenze der Aufnahmen darstellte. Im finalen Schritt wurden über den sogenannten Otsu-Algorithmus alle Signale ab einer bestimmten Graustufe in weiße Voxel umgewandelt, alle dunkleren Signale wurden schwarz. So konnten die Biofilm-Signale von den Hintergrundsignalen unterschieden werden.

Mithilfe der binarisierten Biofilm-Aufnahmen konnten nun Parameter berechnet werden, die den Biofilm quantitativ beschreiben und das Wachstum sowie die Morphologie vergleichbar machen. Dazu gehören das Biovolumen, die Wachstums- oder Akkumulationsrate, der Bedeckungsgrad der Elektrodenoberfläche sowie die Porosität des Biofilms.

Die Berechnung des Biovolumens erfolgte dabei nach Wagner und Horn (2017). Das **absolute Volumen des Biofilms** BV_{abs} ist aus den OCT-Aufnahmen bekannt. Es wird berechnet, indem die Gesamtzahl der weißen Voxel in einer Aufnahme mit dem Volumen eines Voxels multipliziert

wird. Es wird in mm^3 angegeben:

$$BV_{abs} = V_{Voxel} * n_{Voxel} \quad (2.3)$$

Durch Relation des absoluten Biovolumens auf die aufgenommene Fläche A_S wird das **relative Biovolumen** BV_{rel} bestimmt. Dieses wird in der Literatur häufig verwendet, da so Biofilmhöhen mit einander verglichen werden können. Es wird in $\mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$ angegeben:

$$BV_{rel} = \frac{BV_{abs}}{A_S} \quad (2.4)$$

Um den Verlauf des Biovolumens über die Zeit insbesondere bei verschiedenen hoch gewachsenen Biofilmen besser mit einander vergleichen zu können, wurde das Biovolumen auf das finale bzw. das maximal erreichte Biovolumen BV_{max} bezogen und dadurch normalisiert. Das **normalisierte Biovolumen** BV_{norm} ist ohne Einheit:

$$BV_{norm} = \frac{BV_{abs}}{BV_{max}} \quad (2.5)$$

Für die Bestimmung der Geschwindigkeit des Aufwuchses wurde die **Biofilm-Wachstumsrate** BV_{abs}^* definiert. Diese beschreibt die zeitliche Änderung des absoluten Biovolumens in $\text{mm}^3 \text{d}^{-1}$. Solange jedoch noch planktonische Zellen im Medium vorhanden waren, konnte bei einer Volumenänderung nicht von reinem biologischen Wachstum ausgegangen werden. Um die sedimentierenden Zellen begrifflich zu inkludieren, wurde in diesen Fällen der Begriff Akkumulationsrate verwendet.

$$BV_{abs}^* = \frac{\partial BV_{abs}}{\partial t} \quad (2.6)$$

Ein natürlicher Biofilm wächst meist nicht komplett kompakt, sondern mit Hohlräumen (Flemming et al., 2016). Der Anteil dieser Hohlräume am Gesamtvolumen kann über die **Porosität** Φ angegeben werden. Um die Porosität aus den OCT-Aufnahmen zu bestimmen, wurde die theoretische Höhe des Biofilms ohne Hohlräume $h_{kompakt}$ von der tatsächlichen Höhe des Biofilms mit Hohlräumen h_{real} abgezogen und anschließend erneut durch h_{real} geteilt. Durch Multiplikation mit 100 % kann die Porosität in Prozent angegeben werden.

$$\Phi = \frac{h_{real} - h_{kompakt}}{h_{real}} * 100\% \quad (2.7)$$

Neben der Berechnung verschiedener Parameter können die binarisierten Aufnahmen des Biofilms auch dazu dienen, Höhenprofile des Biofilms zu erstellen. Hierzu wird der jeweils höchstgelegene Signalwert aus jedem A-Scan auf eine Oberfläche projiziert. Die ihm zugewiesene Farbe repräsentiert die Höhe an dieser Stelle. So kann die Höheninformation eines ganzen Biofilms in einem zweidimensionalen Diagramm abgebildet werden. Die Entwicklung der Methodik erfolgte nach Wagner und Horn (2017). Hellere Farben stehen hierbei für mehr Höhe, schwarze Pixel zeigen die unbedeckte Elektrodenoberfläche.

Aus den Höhenprofilen kann der Anteil der unbedeckten Elektrodenoberfläche abgelesen werden, indem die Zahl der schwarzen Pixel durch die Gesamtpixelzahl der aufgenommenen Fläche dividiert wird. Um den Anteil der von Biofilm bedeckten Elektrodenoberfläche, den **Bedeckungsgrad BG** zu bestimmen, muss die unbedeckte Elektrodenoberfläche A_{UB} von der Gesamtfläche A_S abgezogen, durch die Gesamtfläche dividiert und mit 100 % multipliziert werden:

$$BG = \frac{A_S - A_{UB}}{A_S} * 100\% \quad (2.8)$$

Mithilfe der Höhenprofile konnte zudem die **mittlere Höhe** der Biofilme in μm bestimmt werden. Im Gegensatz zum relativen Biovolumen berücksichtigte diese auch die Hohlräume in den Biofilmen, da die oberste Schicht des Biofilms betrachtet wurde.

2.3.6 Modellierung des Prozesses mit COMSOL Multiphysics

Die Konzentration des im Medium gelösten Sauerstoffs spielt eine wichtige Rolle im Prozess (s. Kapitel 1.2.5). Der Sauerstoffbedarf ändert sich mit zunehmendem Bedeckungsgrad sowie mit steigender Biofilmdicke. Eine zu hohe Sauerstoffkonzentration kann sich zudem negativ auf die Energieeffizienz eines Prozesses zur mikrobiellen Elektrosynthese auswirken. Deshalb war es notwendig, die Sauerstoffkonzentration im System immer genau an den aktuellen Bedarf der Mikroorganismen anzupassen. Um diesen Bedarf bestmöglich zu verstehen, wurde im Vorhinein eine in-silico Modellierung der eindimensionalen Konzentrationsprofile von Sauerstoff und Wasserstoff über die Dicke des Biofilms erstellt. Die Modellierung wurde mit COMSOL Multiphysics (Version 6.2) berechnet und erstellt. Das Prinzip basiert auf einer Modellierung, welche von Korth und Kolleg:innen (2015) entwickelt wurde, wurde jedoch auf kathodisches Biofilmwachstum und Wasserstoff als Elektronen Shuttle angepasst. Zudem wurde die Modellierung stark vereinfacht. Es wurden nur die Diffusionsprofile von Sauerstoff und Wasserstoff über den Biofilm betrachtet. Kohlenstoffdioxid ist in einem solchen Überschuss vorhanden, dass keine Limitierung angenom-

men wurde. Es wurde angenommen, dass Sauerstoff in einer gewissen Konzentration $c_{O_2,L}$ im Medium gelöst ist. Er diffundiert in den Biofilm, weshalb die Sauerstoffkonzentration über die Dicke des Biofilms in Richtung der Elektrode abnimmt. Das Konzentrationsprofil wird durch die Gleichung 2.9 beschrieben.

$$r_{O_2} = D_{O_2} \cdot \frac{d^2 c_{O_2}}{dx^2} \quad (2.9)$$

Auch das Konzentrationsprofil von Wasserstoff über die Länge des Biofilms kann über die Diffusionsgleichung berechnet werden (Gleichung 2.10). Hierbei nimmt die Konzentration jedoch in Richtung der Biofilmoberfläche ab, da der Wasserstoff an der Kathode entsteht und somit in die dem Sauerstoff entgegengesetzte Richtung diffundiert.

$$r_{H_2} = D_{H_2} \cdot \frac{d^2 c_{H_2}}{dx^2} \quad (2.10)$$

Die Konzentrationsprofile von Wasserstoff bzw. Sauerstoff wurden bestimmt, indem der jeweilige Verbrauch im Biofilm von der lokalen Konzentration, basierend auf der Diffusion, subtrahiert wurde. Die Verbrauchsdaten für Sauerstoff r_{O_2} und Wasserstoff r_{H_2} können aus dem jeweiligen Bedarf an Sauerstoff Y_{O_2} bzw. Wasserstoff Y_{H_2} , bezogen auf die Biomasse, und der Biofilmbildungsrate bestimmt werden (Gleichung 2.11 bis 2.13).

$$r_{O_2} = -Y_{O_2} \cdot r_x \quad (2.11)$$

$$r_{H_2} = -Y_{H_2} \cdot r_x \quad (2.12)$$

$$r_x = \mu_{\max} \cdot c_x \cdot \frac{c_{O_2}}{K_{O_2} + c_{O_2}} \cdot \frac{c_{H_2}}{K_{H_2} + c_{H_2}} \quad (2.13)$$

Eine Übersicht der einzelnen Parameter zur Berechnung wurde in Tabelle 4 angegeben. Für die Berechnung der Lösungen der Differentialgleichungen wurde eine Kultivierungstemperatur von 60 °C angenommen.

Einige Parameter, die insbesondere spezifisch für *K. spormannii* oder das beschriebene System sind, wurden eigens in dieser Arbeit ermittelt. Dazu gehört auch die Biofilmdicke L_F , welche

Tabelle 4: Parameter zur Modellierung der Konzentrationsprofile von Sauerstoff und Wasserstoff über die Biofilmdicke in COMSOL Multiphysics. Einige Parameter wurden im beschriebenen System im Rahmen dieser Arbeit selbst bestimmt, andere wurden aus der Literatur übernommen.

Parameter				Quelle
c_x	1187	mol m^{-3}	Biomasse-Konzentration im Biofilm	diese Arbeit
$c_{O_2,L}$	0,07	mol m^{-3}	Gelöstsauerstoffkonzentration im Medium	(Henry und Banks, 1803)
D_{H_2}	$1,208 \cdot 10^{-8}$	$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$	Diffusionskoeffizient von Wasserstoff im Biofilm	(Haynes, 2016; Horn und Morgenroth, 2006)
D_{O_2}	$4,56 \cdot 10^{-9}$	$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$	Diffusionskoeffizient von Sauerstoff im Biofilm	(Haynes, 2016; Horn und Morgenroth, 2006)
K_{H_2}	$0,5 \cdot 10^{-6}$	mol L^{-1}	Monod-Koeffizient Wasserstoff	(Batstone et al., 2002)
K_{O_2}	$6 \cdot 10^{-6}$	mol L^{-1}	Monod-Koeffizient Sauerstoff	nach (Henze et al., 2006)
L_F	300	μm	Biofilmdicke	diese Arbeit
M_x	22,4	g mol^{-1}	Molekulargewicht Biomasse	(McKinlay und Harwood, 2011)
$r_{H_2,S}$	$3,43 \cdot 10^{-6}$	$\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Wasserstoffentstehungsrate an der Kathode	diese Arbeit
μ_{\max}	0,19	d^{-1}	Maximale Wachstumsrate des Biofilms	diese Arbeit
Y_{H_2}	7,5	mol mol^{-1}	Wasserstoffverbrauch pro Biomasse	diese Arbeit
Y_{O_2}	2,34	mol mol^{-1}	Sauerstoffverbrauch pro Biomasse	diese Arbeit

hier exemplarisch mit $300 \mu\text{m}$ angenommen wurde. Die maximale Wachstumsrate μ_{\max} war für alle Experimente ähnlich und wurde über die Formel 2.14 bestimmt. Die Indizes 1 bzw. 2 beim Biovolumen BV_{abs} stehen hier jeweils für einen Zeitpunkt 1 zu Beginn bzw. Zeitpunkt 2 zum Ende der Wachstumsphase.

$$\mu_{\max} = \frac{1}{\Delta t} \cdot \ln\left(\frac{BV_{abs,2}}{BV_{abs,1}}\right) \quad (2.14)$$

Auch die Biomasse-Konzentration c_x im Biofilm wurde anhand eigener Daten berechnet. Hierfür wurde die Stoffmenge der Biomasse unter Berücksichtigung der Porosität auf das Biovolumen bezogen (Gleichung 2.15). Die Bestimmung der Trockendichte ρ_{BTM} wird in Abschnitt 2.3.7 erklärt.

$$c_x = \frac{BV_{abs} \cdot \rho_{BTM}}{M_x} \cdot \frac{(100 - \Phi)}{BV_{abs} \cdot 100} \quad (2.15)$$

Das Molekulargewicht der Biomasse wurde aus McKinlay und Harwood (2011) und der von ihnen vorgeschlagenen Biomasse-Zusammensetzung $CH_{1,8}N_{0,18}O_{0,38}$ abgeleitet. Der molare Verbrauch an Sauerstoff und Wasserstoff pro Biomasse konnte aus den Knallgas-basierten Studien zum autotrophen Metabolismus (Kapitel 2.2) bestimmt werden. Da aus 1 mol CO_2 genau 1 mol Biomasse

entsteht, können die Werte, welche sich auf den Verbrauch von CO_2 beziehen, direkt auch für den Aufbau von Biomasse verwendet werden. Um die Randbedingung an der Grenzfläche zwischen Biofilm und Elektrode festzulegen, wurde die Entstehungsrate von Wasserstoff an der Kathode bestimmt. Hierfür wurde der elektrische Strom, welcher bei Betrieb der Fließzelle bei -500 mV vs. SHE aufgezeichnet wurde, mithilfe der Faraday-Konstante in einen Stoffmengenstrom an Wasserstoff, welcher pro Sekunde theoretisch auf einem Quadratmeter Kathodenoberfläche entsteht, umgerechnet (siehe Formel 2.16).

$$r_{H_2,S} = \frac{I}{2 \cdot F} \quad \text{in } \frac{\text{mol}}{\text{s} \cdot \text{m}^2} \quad (2.16)$$

Hierbei wurde die Stromstärke I mit $57222 \text{ C s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ angenommen. Dies entspricht der mittleren Stromstärke, welche für den Biofilmaufwuchs bei -500 mV vs. SHE aufgezeichnet wurde. Für die Berechnung der Wasserstoffentstehungsrate wurde eine mögliche abiotische Sauerstoffreduktion nicht berücksichtigt, da der Anteil an abiotisch reduziertem Sauerstoff zu diesem Zeitpunkt nicht bestimmt werden konnte. Es wurde also die maximale Entstehungsrate von Wasserstoff angenommen. Als Randbedingung auf Seite der Biofilm-Flüssig-Grenzfläche wurde die Gelöstsauerstoffkonzentration angenommen, welche sich bei $1,5 \text{ bar}$ Überdruck im Kopfraum der Fließzellen bei einem gewählten Sauerstoffanteil zwischen $2 - 10 \%$ einstellt. Diese Konzentration wurde unter Annahme von idealem Gasverhalten aus dem Gesetz von Henry berechnet (Henry und Banks, 1803). Dies war zugleich der Parameter, anhand welchem die optimale Sauerstoffkonzentration in der Gasphase in jeder Aufwuchsphase bestimmt wurde. Bei einer Sauerstoffkonzentration von 4 vol-\% liegt an der Grenzfläche demnach beispielhaft eine Gelöstsauerstoffkonzentration von $0,07 \text{ mol m}^{-3}$ vor. Die Diffusionskoeffizienten von Sauerstoff und Wasserstoff im Biofilm wurden von den Diffusionskoeffizienten in Wasser abgeleitet. Diese wurden aus den CRC-Tabellen übernommen und mit einer angenommenen Zunahme von 3% pro Grad Kelvin auf $60 \text{ }^\circ\text{C}$ angepasst (Haynes, 2016). Die Diffusion in Biofilmen ist im Vergleich zu Wasser langsamer, weshalb die Werte mit einem Faktor von $0,8$ multipliziert wurden (Horn und Morgenroth, 2006). Auch die Monod-Konstanten K_{O_2} und K_{H_2} wurden aus der Literatur übernommen (Henze et al., 2006; Batstone et al., 2002). Es handelt sich um typische Werte für aerobe, autotrophe Knallgasbakterien.

2.3.7 Bestimmung der Prozesseffizienz

In dieser Arbeit wurde die oxische mikrobielle Elektrosynthese im Hinblick auf ihre Energieeffizienz beurteilt. Dafür wurden insbesondere die beiden folgenden Parameter betrachtet: Die **Coulomb'sche Effizienz** (CE) beschreibt, welcher Anteil der dem System zugeführten Elektronen für den Aufbau von Biomasse verwendet wurde. Je höher die Coulomb'sche Effizienz, desto geringer sind die abiotischen Elektronenverluste. Die Coulomb'sche Effizienz kann entweder als Endpunktanalyse oder in zeitlicher Abhängigkeit berechnet werden. Für die zeitliche Abhängigkeit muss berücksichtigt werden, dass sich sowohl die Biomasse als auch die zugegebenen Elektronen über die Zeit akkumulieren. Deshalb musste bei der Berechnung die Stromstärke über die Zeit integriert werden. In Gleichung 2.17 ist die Formel zur Berechnung der Coulomb'schen Effizienz über die Zeit dargestellt:

$$CE(t) = \frac{BV(t) \cdot \rho_{BTM} \cdot n_e^{BTM} \cdot F}{\widetilde{M}_{BTM} \cdot \int_0^t I(t) dt} \cdot 100\% \quad \text{in \%} \quad (2.17)$$

Die Formel wurde nach Das und Ghangrekar (2018) abgewandelt. Um die Stoffmenge der Elektronen zu berechnen, welche für den Aufwuchs des Biofilms bis zum Zeitpunkt t benötigt wurden, musste zunächst die Stoffmenge des aufgewachsenen Biofilms bestimmt werden. Aus den OCT-Aufnahmen war das Biovolumen BV in mm^3 bekannt. Für die Umrechnung des Biovolumens in das Trockengewicht des Biofilms wurde die Trockendichte ρ_{BTM} ermittelt. Hierfür wurde ein gut gewachsener Biofilm am Ende der Wachstumsphase aus der Fließzelle geerntet (siehe Kapitel 2.3.3). Es wurde sowohl vor als auch nach dem Ablösevorgang eine OCT-Aufnahme der gesamten Elektrode gemacht, um die Differenz im Biovolumen zu bestimmen. Die abgelösten Biofilmpartikel wurden aufgefangen und mit einem trockenen Sterilfilter vom Medium separiert. Anschließend wurde der Sterilfilter für drei Tage bei 50°C getrocknet und das Gewicht erneut bestimmt. Aus der Gewichts-differenz konnte die Trockenmasse der geernteten Biomasse errechnet werden. Die Trockendichte ergab sich durch Division der Trockenmasse durch die Differenz im Biovolumen. Die Bestimmung erfolgte im Triplikat. Der errechnete Mittelwert der Trockendichte lag bei $0,03036 \text{ mg mm}^{-3} \pm 0,002 \text{ mg mm}^{-3}$. Die Division durch das Molekulargewicht von Biomasse, welches aus der allgemeinen Summenformel nach McKinlay und Harwood abgeleitet wurde, ergab die Stoffmenge des aufgewachsenen Biofilms.

Der Elektronenbedarf für den Aufwuchs dieser Biomasse wurde wiederum aus den Studien zum autotrophen Metabolismus (Kapitel 2.2) abgeleitet. Aus einem Wasserstoffbedarf von $7,5 \text{ mol}$ pro mol CO_2 ergibt sich ein Elektronenbedarf n_e^{BTM} von 15 mol pro mol Biotrockenmasse.

Das Integral der Stromstärke beschreibt die in das System jeweils bis zum Zeitpunkt t investierte elektrische Ladung. Um die Stoffmenge der dem System zugeführten Elektronen zu berechnen, musste die Ladung durch die Faraday-Konstante $F = 96,485 \text{ C mmol}^{-1}$ dividiert werden.

Neben der Coulomb'schen Effizienz wurde des Weiteren der **Energiebedarf** E_{BTM} für den Aufwuchs einer bestimmten Menge an Biotrockenmasse bestimmt. Dabei wurde nur jener Anteil der elektrischen Energie berücksichtigt, welcher vom Potentiostaten aufgebracht und direkt für den Aufwuchs des Biofilms verwendet wurde. Die elektrische Energie wurde aus dem Integral der Leistung bestimmt, welche aus dem Produkt aus Zellspannung und Stromstärke berechnet wurde. Die elektrische Energie wurde auf die in dem betrachteten Zeitraum gebildete Biomasse bezogen:

$$E_{BTM} = \frac{\bar{U} \cdot \int_0^t I(t) dt}{BV(t - t_0) \cdot \rho_{BTM}} \quad \text{in} \quad \frac{kWh}{kg} \quad (2.18)$$

Für die Zellspannung \bar{U} wurde der Mittelwert über den betrachteten Zeitraum bestimmt.

2.4 Produktion eines mikrobiellen Speicherpolymers

Es ist bekannt, dass *K. spormannii* unter bestimmten Bedingungen ein Speicherpolymer aus der Gruppe der Polyhydroxyalkanoate produzieren kann (Reiner et al., 2020; Pillot et al., 2022a). Dies konnte auch in dieser Arbeit mittels einer qualitativen Bestimmung in den Zellen nachgewiesen werden.

2.4.1 Produktion des Speicherpolymers unter heterotropher und autotropher Kultivierung

Die heterotrophe Kultivierung erfolgte wie bereits beschrieben in RR2A-Medium. Im Gegensatz zur heterotrophen Kultivierung wurde die autotrophe Kultivierung unter Nährstofflimitierung durchgeführt. In der Literatur wurde gezeigt, dass die im Medium vorliegende Stickstoffkonzentration einen Einfluss auf die Polyhydroxybuttersäure-Produktion in Mikroorganismen haben kann (Wang und Lee, 1997; Miyahara et al., 2022). Unter Vorhandensein einer Kohlenstoffquelle bei gleichzeitiger Nährstofflimitierung kann kein weiterer Biomasseaufbau erfolgen, weshalb der überschüssige Kohlenstoff zur Synthese intrazellulärer Speicherpolymere verwendet wird. Aus diesem Grund wurde das bereits beschriebene ES-Medium folgendermaßen abgewandelt (Tabelle

5). Neben der Stickstoffkonzentration wurde auch die Phosphat-Konzentration durch zehnfaches Verringern der Kaliumdihydrogenphosphat-Konzentration reduziert.

Tabelle 5: Zusammensetzung des für die PHB-Produktion adaptierten ES-Mediums. Der pH-Wert wurde mit 1 M NaOH auf 3,5 eingestellt; die Zusammensetzung des Wolfe's mineral elixirs ist in Tab. 3 gezeigt.

Komponente	Konzentration
Ammoniumchlorid	0,025 g L ⁻¹
Natriumchlorid	0,15 g L ⁻¹
Kaliumdihydrogenphosphat	0,004 g L ⁻¹
Calciumchlorid (0,1 M)	1 mL L ⁻¹
Magnesiumsulfat	0,12 mL L ⁻¹
Wolfe's mineral elixir	1 mL L ⁻¹

Nach einer zweitägigen, heterotrophen Kultivierungsphase für den Biomasseaufbau wurde die Biomasse zweifach bei 6000 ×g für jeweils 10 min mit dem adaptierten ES-Medium gewaschen und anschließend weitere zwei Tage bei 60 °C in dem adaptierten ES-Medium kultiviert. Als Kohlenstoff- und Energiequelle diente eine Knallgasmischung mit einer Zusammensetzung von 70 vol-% Wasserstoff, 20 vol-% Kohlenstoffdioxid und 10 vol-% Sauerstoff. In dieser zweiten Phase sollte die Produktion des Speicherpolymers induziert werden.

2.4.2 Qualitativer Nachweis des Speicherpolymers

Das Vorhandensein des Speicherpolymers in den Zellen wurde zunächst qualitativ nachgewiesen. Durch Zugabe des fluoreszierenden Farbstoffs LipidGreen2 wurden neutrale Lipide, jedoch keine Phospholipide, angefärbt. Dies bot gegenüber anderen Farbstoffen, wie beispielsweise Nilrot, den Vorteil, dass die Zellmembranen nicht eingefärbt wurden und die Einfärbung somit definierter war. Für die Behandlung wurde zunächst eine LipidGreen2-Stocklösung von 5 mg mL⁻¹ in Dimethylsulfoxid (DMSO) hergestellt. Diese wurde von Licht abgeschirmt im Kühlschrank aufbewahrt. Für jeden Versuch wurde daraus durch Verdünnen jeweils eine frische Arbeitslösung von 540 µM hergestellt.

Für die Einfärbung wurde die zu untersuchende Biomasse nach der Ernte zunächst in ES-Medium gewaschen. Nach Zugabe der LipidGreen2-Arbeitslösung zum Kulturvolumen (10 vol-%) wurde die Probe für 10 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 16000 ×g für 1 min gewaschen und mikroskopiert. Für die Untersuchung wurden 5 µl der Probe auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen abgedeckt.

Die Mikroskopaufnahmen erfolgten mit einem Leica DM5500B-Mikroskop, welches mit der Leica

K5-14401820-Kamera ausgestattet war (Leica Microsystems, Wetzlar). Die Aufnahmeparameter wurden mit der Leica Application Suite X-Software (Version 3.8.0.26413) eingestellt. Lipid-Green2 wird bei einer Wellenlänge von 440 nm angeregt und emittiert bei 505 nm, deshalb wurde als Filter der L5-Fluoreszenzfilter von Leica gewählt. Die Proben wurden mithilfe des HCX PL Fluotar-Objektivs unter Verwendung eines Immersionsöls in 100-facher Vergrößerung untersucht.

2.4.3 Extraktion des Speicherpolymers

Für die Identifizierung und anschließende Quantifizierung des Speicherpolymers musste dieses zunächst aus den Zellen extrahiert und isoliert werden. Hierfür wurde folgendes Protokoll aus der Literatur verwendet (Sei Kwang Hahn et al., 1995): Die Biomasse wurde nach der Ernte zunächst bei 70 °C für mindestens einen Tag getrocknet. Pro Gramm Biotrockenmasse wurden anschließend 50 mL einer 30 %-igen (v/v) Natriumhypochlorit-Lösung und 50 mL Chloroform zugegeben. Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 38 °C inkubiert und dabei regelmäßig gerührt. In dieser Zeit lysierten die Zellen unter dem Einfluss des Natriumhypochlorit, und das Speicherpolymer wurde in Chloroform extrahiert. Nach einer Stunde folgte eine zehnminütige Zentrifugation bei 4000 ×g, woraufhin sich drei Phasen bildeten. Die obere Phase bestand größtenteils aus Natriumhypochlorit, die untere Phase aus Chloroform, in welchem sich das Speicherpolymer gelöst hatte. In der Mitte zwischen den beiden Phasen sammelten sich Zellbruchstücke und Restbiomasse. Die untere Phase wurde mit einer Pipette in ein frisches Gefäß überführt. Durch Zugabe von Aceton in einem Verhältnis von 5:1 bezogen auf das Volumen von Chloroform wurde das Speicherpolymer gefällt und sammelte sich als weißes Pulver am Boden des Gefäßes. Die Lösemittel wurden anschließend bei Raumtemperatur verdampft.

2.4.4 Identifizierung des Speicherpolymers

Eine Analyse der Elementarzusammensetzung des Extraktes in Bezug auf die Komponenten Kohlenstoff, Stickstoff, Wasserstoff und Schwefel (CNHS) wurde an der Universität Hamburg in Auftrag gegeben und mit dem Messgerät Unicube der Firma Elementar (Langensfeld, DE) durchgeführt. Zur weiteren Identifizierung des Extraktes wurde eine Kernspinresonanzspektroskopie (engl. Nuclear Magnetic Resonance, NMR), ebenfalls an der Universität Hamburg, in Auftrag gegeben. Die Analyse wurde mit einem AVIII600-System der Firma Bruker (Massachusetts, USA) bei 600,13 MHz durchgeführt. Zur Vorbereitung wurde das Speicherpolymer extrahiert (s. vorheriger Absatz), jedoch wurde deuteriertes Chloroform für die Extraktion verwendet. Da Deuterium nicht NMR-aktiv ist, konnten so die Störsignale durch das Lösemittel reduziert werden.

Neben der eindimensionalen wurde auch eine zweidimensionale Kernspinresonanzspektroskopie (engl. TOCSY, Total Correlated Spectroscopy) durchgeführt.

Sowohl bei heterotropher Anzucht in RR2A-Medium (Tab.1) als auch bei autotropher Anzucht der Zellen (s. Kapitel 2.4.1) konnte das akkumulierte Speicherpolymer anschließend mittels einer Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) als Poly-(3)-Hydroxybuttersäure (P3HB) identifiziert werden. Hierfür wurde der Extrakt zunächst für 1 h bei 100 °C in 1 mL konzentrierter Schwefelsäure (H₂SO₄) hydrolysiert. Anschließend wurde die Probe mit doppelt destilliertem Wasser auf 5 mM H₂SO₄ verdünnt und mit einem PTFE-Filter (0,2 µm) filtriert. Im Anschluss wurden 200 µL der Probe auf der HPLC analysiert. Als Standard für die Konzentrationsbestimmung diente kommerziell erhältliche Poly-(3)-Hydroxybuttersäure. Diese wurde in Mengen zwischen 1 und 100 mg eingewogen und anschließend der gleichen Behandlung unterzogen wie der Extrakt aus der Biomasse.

Für alle HPLC-Analysen wurde das Thermo Scientific™ UltiMate™ 3000 UHPLC-System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet. Bei einer Temperatur von 60 °C wurden 50 µL der Probe auf die Säule injiziert. Als Eluent diente eine Lösung aus 5 mM H₂SO₄ in doppelt destilliertem Wasser. Dieser transportierte die Probe mit einer Flussrate von 0,5 mL min⁻¹ über die Säule. Es wurde eine Hi-Plex H PL1170-6830 (7,7 × 300 mm) 8 µm HPLC-Säule (Agilent Technologies, Waldbronn, DE) verwendet. Eine Messung dauerte 30 min. Zur Detektion der Analyten wurde der UV-Detektor Dionex UltiMate 3000 Diode Array Detektor (Dionex Softron GmbH, Germering, DE) verwendet, welcher die Absorption bei 210 nm aufnahm. In der zugehörigen Software Chromeleon 7.2 SR4 konnten nun über die zuvor erstellte Kalibriergerade aus den Peakflächen die tatsächlichen P3HB-Mengen bestimmt werden.

2.5 Zugabe eines funktionalisierten Polymers zu dem Biofilm

Für *Escherichia coli* konnte gezeigt werden, dass durch Zugabe eines synthetischen, funktionalisierten Polymers (Polyacetylen-Urea, pAcU) sowohl die Biofilmbildung als auch der Umsatz verbessert werden konnten (Adoni et al., 2022). Für *K. spormannii* sollte untersucht werden, ob die Zugabe des Polymers einen ähnlich positiven Effekt auf die Biofilmbildung hätte. Um die chemischen Eigenschaften des Polymers zu variieren, wurde es jeweils mit einem von zwölf Aldehyden funktionalisiert. Zur Vorbereitung wurde das pAcU mit einer Konzentration von 10 mg mL⁻¹ in einer 200 mM Essigsäure-Lösung gelöst. Die Endkonzentration entsprach 88 mmol L⁻¹. Dafür

wurde der Ansatz über Nacht bei Raumtemperatur und 180 rpm inkubiert. Die Aldehyde wurden jeweils in 1 mL DMSO eingewogen und gelöst, sodass die Konzentration der Lösungen ebenfalls bei 88 mM lag. Die zwölf getesteten Aldehyde sind in Tabelle 6 aufgeführt. Um die Referenz auf die Aldehyde zu erleichtern, wurde jedem ein Buchstabencode (A bis L) zugewiesen.

Tabelle 6: Aldehyde zur Funktionalisierung des pAcU. Jedes Aldehyd wurde mit einer Konzentration von 88 mmol L^{-1} in 1 mL DMSO gelöst. Die Liste wurde mit einem Buchstabencode von A bis L versehen.

Referenz	Aldehyd
A	Benzaldehyd
B	2-Napthaldehyd
C	1H-Imidazol-4-Carbaldehyd
D	Indol-3-Carboxaldehyd
E	2,3-Dihydroxybenzaldehyd
F	5-Bromsalicylaldehyd
G	Isovaleraldehyd
H	2-Ethylhexylal
I	Uracil-5-Carboxaldehyd
J	4-Fluorbenzaldehyd
K	Hexanal
L	Octanal

Für die Funktionalisierung wurden nun je 500 μL der pAcU-Stocklösung mit 500 μL der jeweiligen Aldehyd-Stocklösung gemischt (Referenzcode: PA bis PL). Zusätzlich wurden mehrere Kontrollen angesetzt. Um den Einfluss des Polymers zu untersuchen, wurden sämtliche Aldehyde jeweils nur mit 200 mM Essigsäure versetzt (Referenzcode: CA bis CL). Der Einfluss der Aldehyde wurde untersucht, indem die pAcu-Stocklösung nur mit DMSO gemischt wurde (Referenzcode: CP). Auch eine Kontrolle, welche nur die beiden Lösemittel Essigsäure und DMSO enthielt, wurde angesetzt (Referenzcode: CS). Alle Ansätze wurden erneut über Nacht bei Raumtemperatur und 180 rpm inkubiert.

In einem ersten Schritt sollte die generelle Kompatibilität von *K. spormannii* mit den Polymer-Aldehyd-Komplexen untersucht werden, zudem erfolgte ein erstes Screening auf mögliche Verbesserung der Biofilmbildung. Die Untersuchungen wurden in einer Mikrotiterplatte durchgeführt. Es wurden jeweils zu 300 μL Kultur mit einer OD von 0,05 in RR2A-Medium 3 μL der zu untersuchenden Substanz zugegeben (PA bis PL, CA bis CL, CS, CP). Zudem wurde eine weitere Kontrolle geführt, welche nur die Zellkultur bei der gleichen OD enthielt (Referenzcode: CZ). Jeder Ansatz wurde im Triplikat getestet. In der Mikrotiterplatte wurde nun eine Wachstumskurve bei 60 °C aufgenommen. Hierfür wurde über 90 h die optische Dichte bei 600 nm mithilfe eines

Infinite200Pro-Plattenlesegeräts (Tecan Trading AG, CH) aufgezeichnet. Im Anschluss an das Wachstumsexperiment sollte die Biofilmbildung in der Mikrotiterplatte untersucht werden. Hierfür wurde die Mikrotiterplatte zunächst durch vorsichtiges Invertieren geleert. Anschließend wurde jedes Well drei Mal mit einer 0,1 M KH_2PO_4 -Lösung gewaschen. Dabei wurde darauf geachtet, dass möglichst wenig Scherkräfte auf die an den Wänden aufgewachsenen Biofilme ausgeübt wurden. Nach den Waschsritten wurden diese Biofilme mit einer 0,1 %-igen Kristallviolett-Lösung eingefärbt. Diese wurde hergestellt, indem 0,5 g Kristallviolett in 25 mL Ethanol gelöst wurden. Die Lösung wurde anschließend mit doppelt destilliertem Wasser auf 500 mL aufgefüllt. Es wurden nun je 300 μL dieser Färbelösung in jedes Well pipettiert und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Kristallviolett-Lösung entfernt. Die Wells wurden mindestens je drei Mal mit doppelt destilliertem Wasser gewaschen, um alle Farbrückstände zu entfernen. Die Mikrotiterplatte wurde nun bei Raumtemperatur getrocknet. Abschließend wurden in jedes Well 300 μL einer 33 %-igen Essigsäurelösung gegeben, um die gefärbten Biofilme rückzulösen. Im Plattenlesegerät wurde die Absorption bei 550 nm gemessen.

Anhand des beschriebenen Screenings konnte eine Auswahl von vier Aldehyden getroffen werden, die weitergehend untersucht wurden. Die Zellen wurden auf die gleiche Weise wie zuvor beschrieben mit dem funktionalisierten Polymer für vier Tage inkubiert, die Kontrollen wurden ebenfalls wie beschrieben durchgeführt. Im Anschluss wurden die Zellen einer Lebend-Tot-Zellfärbung unterzogen. Hierfür wurden jeweils pro 1 mL Zellkultur 1 μL Syto9 (Lebendfärbung) und 1,5 μL Propidiumiodid (Totfärbung) zugegeben. Die Zellen wurden 20 min unter Lichtausschluss inkubiert und im Anschluss drei Mal mit ES-Medium bei 16000 $\times g$ für 1 min gewaschen. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit dem L5 (Syto9) und Y3 (Propidiumiodid) Fluoreszenzfilter des zuvor beschriebenen Fluoreszenzmikroskops von Leica gemacht.

Um den Einfluss der Polymerzugabe auf die Expression der Gene in *K. spormannii* zu untersuchen, wurde eine Transkriptomanalyse durchgeführt. Hierfür wurde zunächst eine frische Kultur in RR2A-Medium angezogen. Diese wurde auf eine OD_{600} von 1 eingestellt. In Triplikaten wurden nun zu je 500 μL dieser Kultur je 100 μL des mit Aldehyd B, C oder K funktionalisierten Polymers zugegeben. Als Kontrolle diente ein weiteres Triplikat der Zellkultur, welcher kein Polymer zugegeben wurde. Alle Ansätze wurden nun für 4 h bei 60 °C inkubiert. Im Anschluss wurden je 600 μL RNeasy Protect (Qiagen, Venlo, NL) zur Stabilisierung der RNA zugegeben. Für die Extraktion der RNA wurde das RNeasy PowerBiofilm Kit (Qiagen, Venlo, NL) verwendet. Die extrahierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Die reverse Transkription und anschließende Illumina-Sequenzierung wur-

de von Eurofins Genomics (Ebersberg, DE) durchgeführt. Für die Auswertung wurden mögliche Veränderungen in der Expression der Gene bei Polymerzugabe im Vergleich zur Kontrollkultur verglichen.

Zuletzt wurde der Einfluss des Polymers auf die Biofilmbildung im bioelektrochemischen System untersucht. Hierfür wurde im direkten Vergleich zu einer biotischen Fließzelle das mit Aldehyd B funktionalisierte Polymer zugegeben und zu einer zweiten nicht. Diese biotische Negativkontrolle wurde durch eine abiotische Negativkontrolle ergänzt, welcher nur das funktionalisierte Polymer, jedoch keine Zellen zugegeben wurden. Alle drei Ansätze wurden bei -500 mV vs. SHE betrieben. Im Gegensatz zu den Vorstudien wurde die Konzentration des funktionalisierten Polymers von 88 mM auf 17,6 mM reduziert. Es wurde dem bioelektrochemischen System in einer Konzentration von 1 mg mL^{-1} zugegeben. Das Biofilmwachstum, bzw. die Akkumulation des Polymers, wurde mittels regelmäßiger OCT-Aufnahmen überwacht. Die biotischen Fließzellen wurden, wie zuvor bereits beschrieben, zunächst abiotisch gestartet, bevor nach einem Tag auf eine OD_{600} von 0,1 inokuliert wurde. Das funktionalisierte Polymer wurde mit den Zellen zugegeben. Der Unterschied zu allen anderen Untersuchungen im bioelektrochemischen System bestand darin, dass die planktonischen Zellen nicht entfernt wurden, nachdem die Elektrodenoberfläche mit Biofilm bedeckt war. Der Grund hierfür war, dass mit dem Medienwechsel auch das Polymer entfernt worden wäre und der Biofilm somit wieder ohne den Einfluss des Polymers gewachsen wäre.

2.6 Weitere Analytik

2.6.1 Korrelation der optischen Dichte mit der Zelltrockenmasse

Die Bestimmung der Zelltrockenmasse war für viele Analysen relevant, um die Ergebnisse auf eine definierte Menge Biomasse beziehen zu können. Um diesen Bezug auch in Flüssigkulturen verwenden zu können, wurde der Zusammenhang zwischen der optischen Dichte bei 600 nm und der Biotrockenmasse für *K. spormannii* aufgenommen. Hierfür wurde eine Kultur in RR2A-Medium angezogen und anschließend für 10 min bei $6000 \times g$ in doppelt destilliertem Wasser gewaschen. Mit diesen Zellen wurden nun in Triplikaten OD zwischen 0 und 1 eingestellt und gemessen. Alle Ansätze wurden für vier Tage bei 70°C getrocknet, bevor das genaue Gewicht bestimmt wurde. Aus den Ergebnissen wurde eine Formel zur Umrechnung von optischer Dichte

(OD) zu Biotrockenmasse (BTM) aufgestellt (Gleichung 2.19):

$$BTM = 0,5403 * OD \quad \text{in} \quad \frac{mg}{mL} \quad (2.19)$$

Das Bestimmtheitsmaß R^2 lag bei 0,97.

2.6.2 Analyse der Biomassezusammensetzung

Zur Untersuchung der Biomassezusammensetzung von *K. spormannii* wurden verschiedene Analysen durchgeführt. Um den Proteingehalt zu bestimmen, wurde die Methode nach Bradford verwendet (Bradford, 1976). Das Prinzip basiert auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie-Brillant-Blau bei Bindung an ein Protein von 465 nm auf 595 nm. Die zu untersuchende Biomasse wurde mit 1 mL 0,2 M Natriumhydroxid-Lösung (NaOH) versetzt und für 10 min bei 95 °C inkubiert, um die Zellen zu lysieren (nach Golitsch et al., 2013). Die Proben wurden in doppelt destilliertem Wasser verdünnt, bevor in einer Mikrotiterplatte im Triplikat zu je 20 µL jeder Probe 180 µL des Bradford-Reagenz (s. Tabelle 7) gegeben wurden. Die Mikrotiterplatte wurde im Anschluss für 30 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss

Tabelle 7: Zusammensetzung des Bradford-Reagenz

Komponente	Menge
Coomassie brilliant blue G250	100 mL
Ethanol (96 %)	50 mL
Konz. Phosphorsäure	100 mL
ddH ₂ O	750 mL

inkubiert. Die Absorption bei 595 nm wurde im Plattenlesegerät gemessen und mit einem Standard verglichen. Als Standard wurde BSA (Bovines Serumalbumin) in den Konzentrationen 0|0,01|0,02|0,04|0,08|0,1|0,15 und 0,2 mg mL⁻¹ verwendet. Über eine Kalibriergerade konnte der Proteingehalt der untersuchten Biomasse bestimmt werden.

Um diesen auf die Biotrockenmasse beziehen zu können, wurde der Gesamtgehalt an organischem Kohlenstoff (Total Organic Carbon, TOC) in den Proben gemessen. Dafür wurden diese in ddH₂O verdünnt und anschließend im TOC-Analysator Multi N/C 2100 S (Analytik Jena, Jena, DE) untersucht. Der Gehalt an Kohlenstoff in der Biotrockenmasse entspricht 53 %. Deshalb konnte durch Multiplikation des gemessenen TOC-Gehalts mit 1,887 die Menge an eingesetzter Biotrockenmasse bestimmt werden.

Die Aminosäurezusammensetzung der Proteine in *K. spormannii* wurde von AltaBioscience (Red-

ditch, UK) untersucht. Für die Untersuchung wurde heterotroph gewachsene Biomasse verwendet, welche zunächst einer sauren Hydrolyse für 24 h bei 110 °C unterzogen wurde, um die Proteine in ihre Aminosäure-Bausteine zu spalten. Anschließend wurden die Aminosäuren chromatographisch getrennt und ihre Konzentration aufgezeichnet.

3 Ergebnisse

Ziel der Arbeit war es, einen Prozess zur bioelektrochemischen Verwertung von Kohlenstoffdioxid aus industriellen Abgasen zu entwickeln. Für den Prozess wurde der thermo- und acidophile Mikroorganismus *Kyrpidia spormannii* als Biofilm auf der Kathode in einem durchströmten bioelektrochemischen System kultiviert. Die Energie für den mikrobiellen Metabolismus wurde von der Kathode in Form von Wasserstoff bereitgestellt. Über die Gasphase wurden Kohlenstoffdioxid als Kohlenstoffquelle und Sauerstoff zugeführt. Für den Betrieb eines zukünftigen industriellen Prozesses war es zunächst wichtig, das System sowohl abiotisch als auch biotisch zu charakterisieren. Des Weiteren sollte der Prozess im Hinblick auf seine Energieeffizienz untersucht werden. Es wurden Strategien entwickelt, um den Prozess möglichst lange und kontinuierlich betreiben zu können. Als mögliche Produkte galten mikrobielles Protein oder der mikrobielle Speicherstoff Polyhydroxybuttersäure. Für eine mögliche Verbesserung des Biofilmwachstums wurden dem System synthetische Polymere zugesetzt und deren Einfluss auf das Biofilmwachstum untersucht. In einem Anwendungsfall wurde der Betrieb des Prozesses mit realem Rauchgas simuliert.

3.1 Abiotische Charakterisierung des bioelektrochemischen Systems

Vor dem Start der biotischen Untersuchungen mit *K. spormannii* sollte das System zunächst abiotisch charakterisiert werden. Diese Charakterisierung inkludierte eine zyklische Voltammetrie, mithilfe derer der Bereich festgelegt werden sollte, in welchem sich das anzulegende Arbeitspotential befinden durfte. Da alle Studien ausschließlich chronoamperometrisch, also mit festgelegtem Potential, betrieben wurden, wurde auch die abiotische Charakterisierung auf Grundlage des angelegten Potentials durchgeführt. In dem verwendeten System war die obere Grenze des Bereichs für das Arbeitspotential 0 mV bezogen auf die Silber-Silberchlorid-Referenzelektrode. Das entsprach einem Potential von 199 mV vs. SHE. Nach unten wurde der Bereich in der praktischen Anwendung durch die Entstehung von makroskopischen Wasserstoffblasen limitiert. Ab einem gewissen Potential war die Wasserstoffentstehungsrate so hoch, dass sich Blasen bildeten, die den Biofilm von der Elektrodenoberfläche ablösten. Diese untere Grenze konnte mithilfe einer zyklischen Voltammetrie definiert werden. Hierfür wurde das Potential zwischen 0 mV vs. SHE

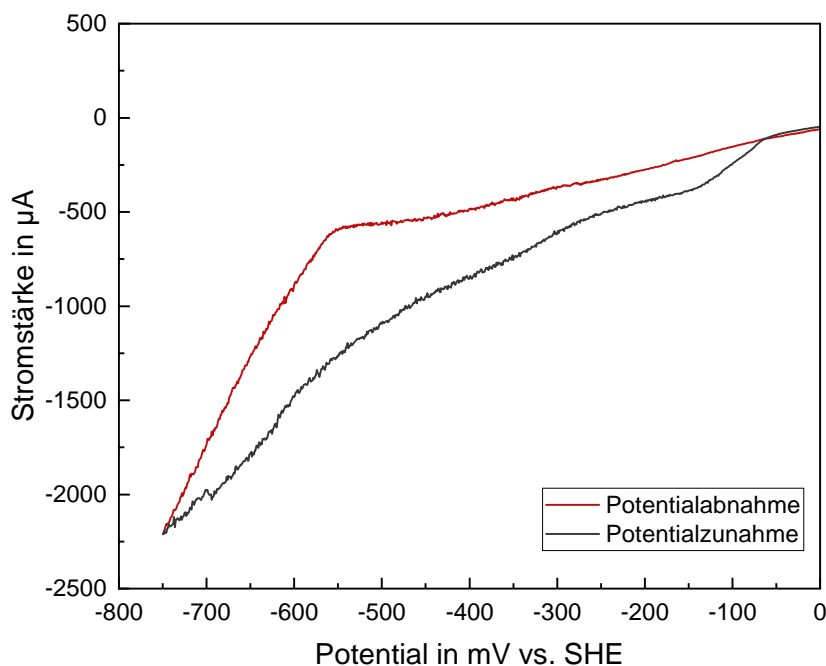


Abbildung 5: Zyklische Voltammetrie zur abiotischen Charakterisierung des Systems. Das Potential wurde zunächst von 0 mV vs. SHE auf -750 mV vs. SHE mit einer Rate von $0,017 \text{ mV s}^{-1}$ gesenkt (rot). Anschließend wurde das Potential mit der gleichen Geschwindigkeit wieder erhöht (grau).

und -750 mV vs. SHE mit einer Rate von $0,017 \text{ mV s}^{-1}$ variiert. Der resultierende Stromfluss wurde aufgezeichnet (Abb. 5).

Zwischen 0 mV und ungefähr -550 mV vs. SHE nahm der Stromfluss mit abnehmendem Potential in etwa linear zu. Auch bei Potentialen niedriger als -550 mV vs. SHE nahm der Stromfluss in etwa linear zu, jedoch mit einer deutlich höheren Geschwindigkeit. Diese Zunahme in der Änderung der Stromstärke mit gleichbleibender Scanrate deutet auf die Entstehung makroskopischer Wasserstoffblasen hin. Deshalb wurde -500 mV vs. SHE als das maximale Arbeitselektrodenpotential für diesen Prozess definiert. Bei der anschließenden Potentialzunahme verringerte sich der Stromfluss nahezu konstant mit höherem Potential.

Auch die Gelöstsauerstoffkonzentration hatte einen Einfluss auf den abiotischen Stromfluss. Bei Anlegen eines negativen Potentials an der Arbeitselektrode diente der Sauerstoff als Elektronenakzeptor. Durch dessen Reduktion entstand ein abiotischer Stromfluss, der vom angelegten Potential und der Gelöstsauerstoffkonzentration abhängig war. Um diesen Zusammenhang zu beschreiben, wurde der Stromfluss bei verschiedenen Gelöstsauerstoffkonzentrationen bei Ar-

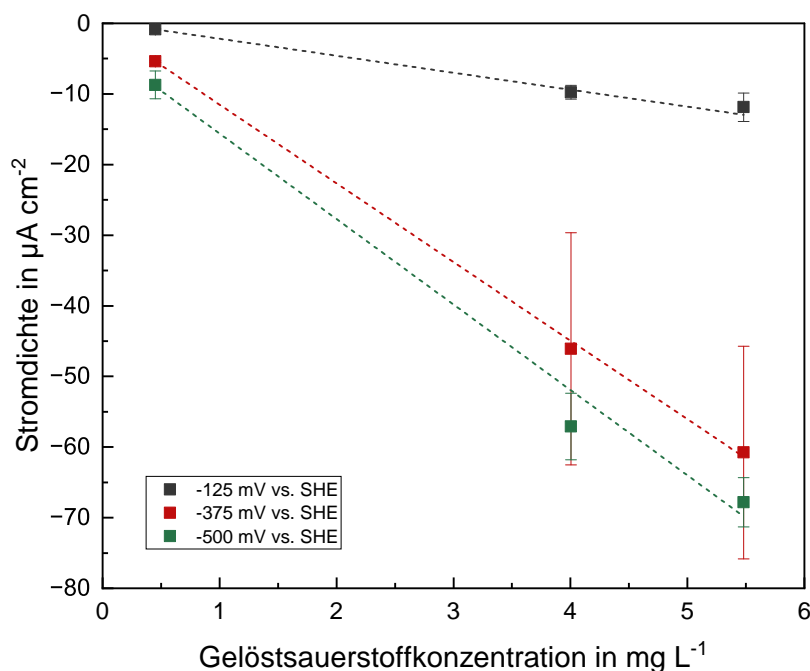


Abbildung 6: Abiotische Korrelation des durch den gelösten Sauerstoff induzierten Stroms mit dem angelegten Potential. Die Stromdichte wurde bei $0,45 \text{ mg L}^{-1}$, $4,01 \text{ mg L}^{-1}$ und $5,48 \text{ mg L}^{-1}$ Gelöstsauerstoff für die Potentiale -125 mV (grau), -375 mV (rot) und -500 mV vs. SHE (grün) in Duplikaten gemessen. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung vom Mittelwert. Zwischen den Messwerten wurde mit gestrichelten Linien eine lineare Korrelation angenommen.

beitsselektrodenpotentialen von -125 mV , -375 mV und -500 mV vs. SHE gemessen (Abb. 6).

Das Potential an der Arbeitselektrode wurde zwischen -125 mV (grau), -375 mV (rot) und -500 mV vs. SHE (grün) variiert. Die Stromdichte wurde bei jeweils $0,45 \text{ mg L}^{-1}$, $4,01 \text{ mg L}^{-1}$ und $5,48 \text{ mg L}^{-1}$ Gelöstsauerstoff gemessen. Die Messwerte konnten mit einem linearen Fit angenähert werden, der für jedes der drei Potentiale einen R-Wert größer als 0,99 aufwies.

3.2 Wachstumskinetiken in Abhängigkeit des angelegten

Potentials

Im vorherigen Kapitel wurde der theoretische Potentialbereich für den Betrieb eines Prozesses zur mikrobiellen Elektrosynthese im beschriebenen bioelektrochemischen System bestimmt. Um den Potentialbereich zu bestimmen, in welchem tatsächlich ein Biofilmaufwuchs möglich ist, wurde die folgende Studie durchgeführt. Hierbei wurde untersucht, wie weit das Potential erhöht werden

konnte, bis kein Biofilmaufwuchs mehr beobachtet wurde. In der Studie wurden vier verschiedene Potentiale untersucht (0 mV vs. SHE, -125 mV vs. SHE, -375 mV vs. SHE und -500 mV vs. SHE). Abgesehen vom Arbeitselektrodenpotential wurden keine weiteren Parameter variiert, um die Experimente miteinander vergleichen zu können. Die Biofilme wurden während der gesamten Kultivierung mittels OCT überwacht. Aus den OCT-Aufnahmen wurden unter anderem das Biovolumen, die Biomasse-Akkumulationsrate, der Bedeckungsgrad und die Porosität bestimmt. In Abb. 7 (A) wurde das normalisierte Biovolumen für alle vier Potentiale gegen die Zeit aufgetragen. Für die Berechnung des normalisierten Biovolumens wurde das relative Biovolumen zu jedem Zeitpunkt auf das maximal im Versuch erreichte Biovolumen bezogen. Dieser jeweilige Maximalwert wurde in Tabelle 8 für jedes Potential angegeben. Ebenso wurde hier die Zeit, nach welcher das maximale Biovolumen erreicht wurde, genannt. Hierbei ist zu beachten, dass in der Studie zu 0 mV vs. SHE das Potential nach 16,7 Tagen auf -500 mV vs. SHE erhöht wurde, da kein relevantes Biofilmwachstum zu beobachten war. Das maximale Biovolumen trat hier 7,5 Tage nach dem Potentialwechsel, also 24,2 Tage nach Beginn des Experiments, auf. Die Daten zu dem Biofilmaufwuchs bei -125 mV und -375 mV vs. SHE wurden bereits in einer früheren Arbeit aufgenommen (Rominger, 2020). Bei -125 mV vs. SHE dauerte die initiale Anlaufphase in etwa zehn Tage, bevor das Biofilmwachstum sich beschleunigte. Nach insgesamt 16,8 Tagen war mit $207,77 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$ das Maximum erreicht. Bei -375 mV und -500 mV vs. SHE gab es keine sichtbare Anlaufphase im Biofilmwachstum. Nach 7,6 Tagen (-375 mV) beziehungsweise nach 8,1 Tagen (-500 mV) war das jeweilige maximale Biovolumen erreicht.

Die Geschwindigkeit des Biofilmwachstums kann über die Akkumulationsrate angegeben werden. Diese ist für alle vier Potentiale in Abb. 7 (B) dargestellt. Die maximale Akkumulationsrate lag für alle Potentiale zwischen $52,13 \text{ mm}^3 \text{ d}^{-1}$ und $62,13 \text{ mm}^3 \text{ d}^{-1}$. Der Maximalwert trat früher auf, je niedriger das angelegte Potential war. In Tabelle 8 kann die genaue Zeit, zu welcher die maximale Akkumulationsrate gemessen wurde, nachgesehen werden. Bei 0 mV vs. SHE wuchs der Biofilm anfangs nur mit $2,9 \text{ mm}^3 \text{ d}^{-1}$. Erst nach dem Potentialwechsel zu -500 mV vs. SHE wurde die maximale Akkumulationsrate von $137,06 \text{ mm}^3 \text{ d}^{-1}$ beobachtet.

Der Bedeckungsgrad beschreibt den Flächenanteil der Arbeitselektrode, welcher mit Biofilm bedeckt ist. Bei -375 mV und -500 mV vs. SHE wurde die vollständige Bedeckung ähnlich schnell, zwischen 2,7 und 4,0 Tagen, erreicht. Für die Kultivierung bei -125 mV vs. SHE dauerte es knapp zehn Tage, bis die Elektrode vollständig mit Biofilm bedeckt war. Bei 0 mV war dies erst nach etwa 17 Tagen der Fall. Der zeitliche Verlauf des Bedeckungsgrades ist für alle Potentiale in Abb. 7 (C) abgebildet.

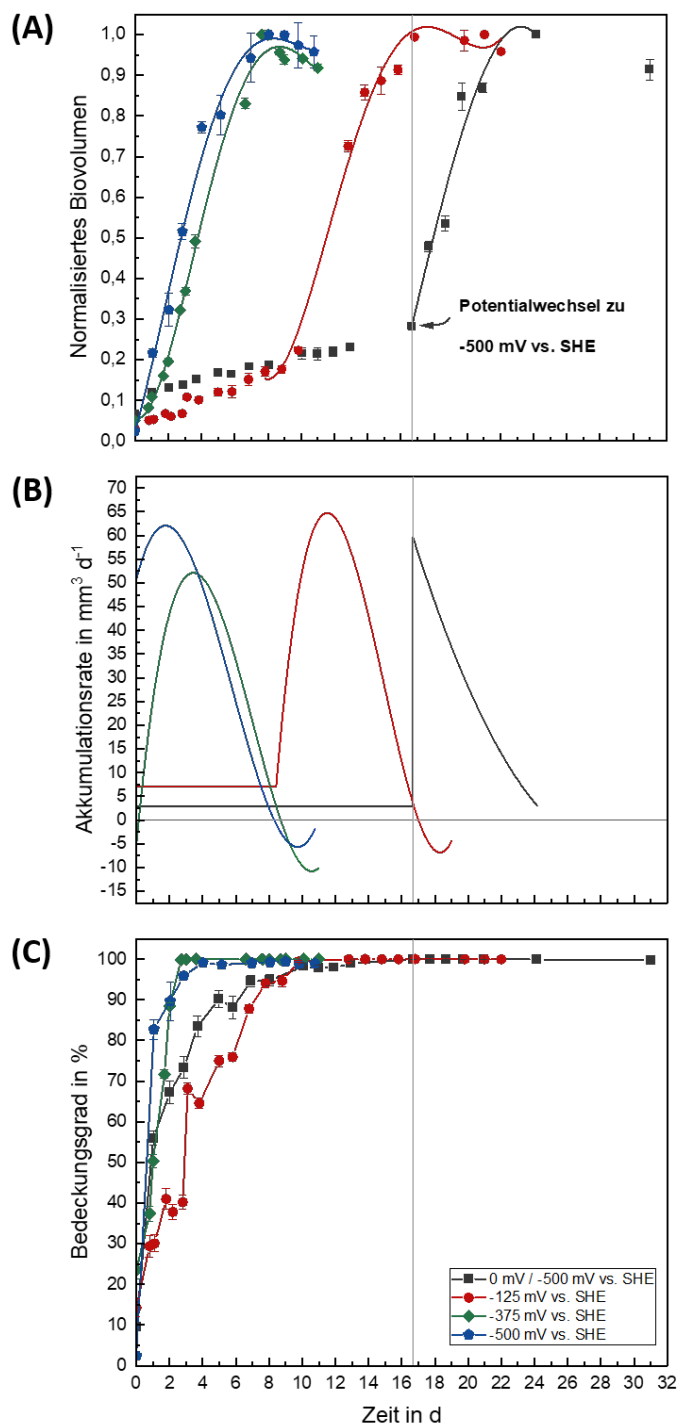


Abbildung 7: Einfluss des Potentials auf das normalisierte Biovolumen (A), die Akkumulationsrate (B) und den Bedeckungsgrad (C). Die genannten Parameter wurden jeweils bei einem Arbeitselektrodenpotential von -500 mV (blau), -375 mV (grün), -125 mV (rot) und 0 mV vs. SHE (grau) untersucht. Das Potential von 0 mV vs. SHE wurde nach 16,7 Tagen auf -500 mV vs. SHE erhöht. Die Daten wurden aus OCT-Aufnahmen in Triplikaten bestimmt. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung vom Mittelwert.

Tabelle 8: Einfluss des Potentials auf das relative Biovolumen, die Akkumulationsrate, den Bedeckungsgrad und die Porosität. Die genannten Parameter wurden jeweils bei einem Arbeitselektrodenpotential von 0 mV, -125 mV, -375 mV und -500 mV vs. SHE untersucht. Das Potential von 0 mV vs. SHE wurde nach 16,7 Tagen auf -500 mV vs. SHE erhöht. Alle Werte, die mit einem * gekennzeichnet sind, wurden nach dem Potentialwechsel bestimmt. Für alle Parameter wurde jeweils der Maximalwert während der gesamten Kultivierungsdauer sowie die Zeit, nach welcher dieser Wert erreicht wurde, angegeben. Alle Parameter wurden aus OCT-Aufnahmen in Triplikaten bestimmt. Die Abkürzung SD bezeichnet die Standardabweichung vom Mittelwert.

0 mV / -500 mV vs. SHE*		Max.	SD	Zeit in d
Relatives Biovolumen	in $\mu m^3 \mu m^{-2}$	137,06*	5,37*	24,2*
Akkumulationsrate	in $mm^3 d^{-1}$	59,63*	2,12*	16,7*
Bedeckungsgrad	in %	99,98	0,01	16,7
Porosität	in %	29,56*	1,14*	31*
-125 mV vs. SHE		Max.	SD	Zeit in d
Relatives Biovolumen	in $\mu m^3 \mu m^{-2}$	207,77	2,63	16,8
Akkumulationsrate	in $mm^3 d^{-1}$	60,35	0,54	11,6
Bedeckungsgrad	in %	99,48	0,21	9,8
Porosität	in %	33,59	0,59	22,0
-375 mV vs. SHE		Max.	SD	Zeit in d
Relatives Biovolumen	in $\mu m^3 \mu m^{-2}$	152,23	4,99	7,6
Akkumulationsrate	in $mm^3 d^{-1}$	52,13	0,83	3,4
Bedeckungsgrad	in %	99,93	0,04	2,7
Porosität	in %	12,92	1,39	11,0
-500 mV vs. SHE		Max.	SD	Zeit in d
Relatives Biovolumen	in $\mu m^3 \mu m^{-2}$	172,09	3,23	8,1
Akkumulationsrate	in $mm^3 d^{-1}$	62,13	4,04	1,8
Bedeckungsgrad	in %	99,14	0,16	4,0
Porosität	in %	28,06	0,97	10,8

In Abb. 8 wurden die Höhenprofile der Biofilme bei den verschiedenen Potentialen dargestellt. Die Morphologie des Biofilms unterschied sich leicht, je nach angelegtem Potential. Nach etwa elf Tagen bei -500 mV vs. SHE wies der Biofilm eine deutlich turmartige Struktur auf. Dabei bedeckte zwar die unterste Schicht des Biofilms die Elektrode vollständig, jedoch wuchs der Biofilm schon ab einer Höhe von wenigen Mikrometern nur noch in Türmen. Die einzelnen Türme waren bis zu 300 μm hoch und hatten einen Abstand von 0,5 bis 1 mm. Eine ähnliche Biofilmstruktur war zu beobachten, nachdem das Potential von 0 mV auf -500 mV vs. SHE erhöht und der Biofilm für weitere 14 Tage kultiviert worden war. Der Abstand der Türme war hier mit bis zu 1,5 mm

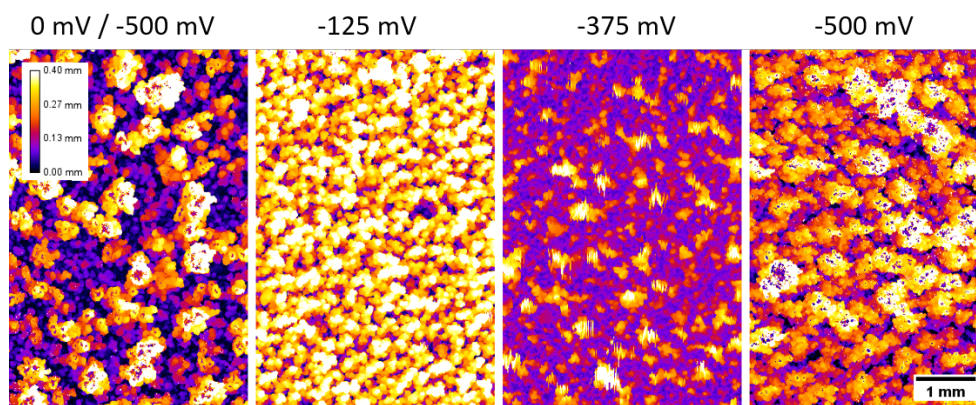


Abbildung 8: Höhenprofile der bei verschiedenen Potentialen aufgewachsenen Biofilme. Die Höhenprofile zeigen eine Draufsicht auf den jeweiligen Biofilm. Die Farben repräsentieren hierbei die Höhe des Biofilms an der jeweiligen Stelle. Die Höhen in der Farblegende sind in mm angegeben. Die Aufnahmedaten wurden so gewählt, dass sich der Biofilm jeweils schon im Endstadium seiner Wachstumsphase befand (Tag 31 für 0 mV / -500 mV vs. SHE, Tag 22 für -125 mV vs. SHE, Tag 11 für -375 mV vs. SHE und Tag 10,77 für -500 mV vs. SHE). Die Biofilme in der Abbildung wurden jeweils von links nach rechts überströmt.

jedoch größer. Der Biofilm, der für 22 Tage bei -125 mV vs. SHE aufgewachsen ist, wies ebenfalls diese Turmstruktur auf, allerdings hatten die Türme hier einen kleineren Durchmesser, und auch der Abstand der Türme zu einander war mit 0,25 bis 0,5 mm deutlich geringer. Die Porosität der Biofilme, welche bei den drei genannten Potentialen aufgewachsen sind, lag um die 30 % (s. Tabelle 8). Nur der Biofilm, welcher bei -375 mV vs. SHE aufgewachsen ist, war mit einer Porosität von 12,92 % im finalen Wachstumsstadium deutlich dichter. Auch waren die Türme hier nicht so eindeutig zu erkennen wie bei den anderen Potentialen, dafür war die untere Biofilmschicht mit durchschnittlich ca. 100 μm deutlich dicker.

3.3 Effizienzbetrachtungen

Prozesse zur oxischen mikrobiellen Elektrosynthese (oMES) sind im Vergleich zur anoxischen MES in der Literatur unterrepräsentiert. Nur wenige Arbeitsgruppen untersuchten bislang derartige Systeme. Dementsprechend fehlt es häufig an grundlegenden Informationen diese Prozesse betreffend (Reiner et al., 2024). Um einen industriellen Prozess zu entwickeln, bedarf es neben den grundlegenden Prozessparametern auch Daten zur Auswertung der energetischen Effizienz eines solchen Prozesses (PrévotEAU et al., 2020). Für den beschriebenen Prozess mit *Kyrpidia spormannii* wurden im Rahmen dieser Arbeit die Coulomb'sche Effizienz des Prozesses sowie der Energiebedarf für den Aufwuchs des Biofilms bestimmt.

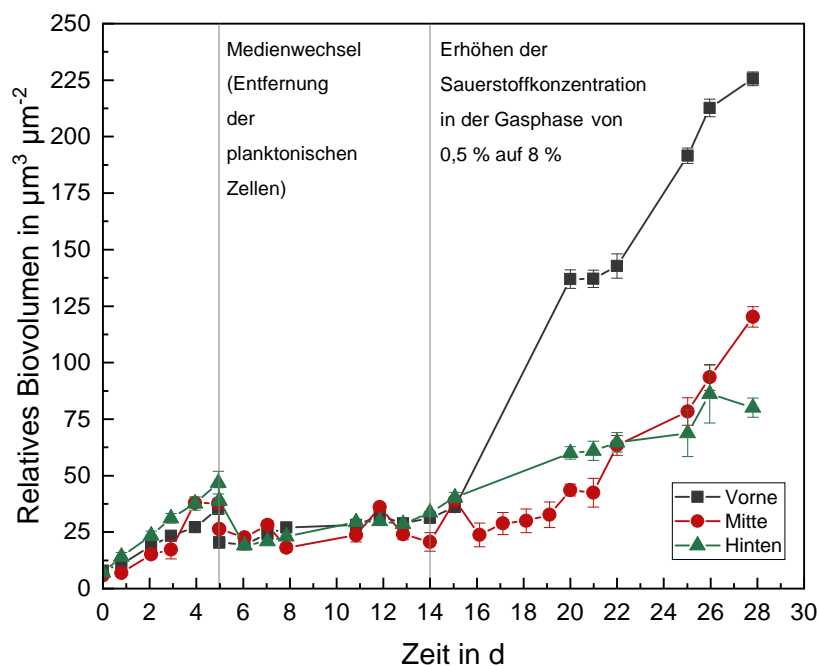


Abbildung 9: Entwicklung des relativen Biovolumens über die Zeit unter Sauerstofflimitierung. Der Biofilm wurde bei -500 mV vs. SHE kultiviert. An Tag fünf wurden durch einen Medienwechsel die planktonischen Zellen aus dem System entfernt. An Tag 14 wurde die Sauerstoffkonzentration in der Gasphase von $0,5\%$ auf 8% erhöht. Im Graph ist die Entwicklung des relativen Biovolumens an der vorderen, der mittleren und der hinteren Messposition gezeigt.

Ein Parameter, der bei der oMES eine wichtige Rolle im Hinblick auf die Prozesseffizienz spielt, ist der Sauerstoff. Die Mikroorganismen benötigen für ihren Metabolismus Sauerstoff als Elektronenakzeptor. Bei Anlegen eines negativen Potentials entsteht an der Gegenelektrode Sauerstoff aus der Elektrolyse von Wasser (Chatenet et al., 2022). Dieser alleine reichte jedoch nicht aus, um ein Biofilmwachstum von *K. spormannii* zu gewährleisten. Das ist gut in den Wachstumskurven in Abb. 9 zu erkennen, wo ein relevantes Biofilmwachstum erst nach Erhöhen der Sauerstoffkonzentration in der Gasphase von $0,5\%$ auf 8% zu beobachten war.

Um die Sauerstofflimitierung im System zu vermeiden, musste also Sauerstoff über die Gasphase zugegeben werden. Allerdings diente der Sauerstoff im System auch als abiotischer Elektronenakzeptor. Sobald also Sauerstoffmoleküle in Kontakt mit der Arbeitselektrode kamen, wurden diese reduziert. Dies erhöhte nicht nur den Stromfluss und verringerte dadurch die Effizienz, die Reaktionsprodukte der Sauerstoffreduktion können zudem auch schädlich für die Mikroorganismen sein und somit das Biofilmwachstum verhindern (Liu et al., 2024). Insbesondere solange die Arbeitselektrode noch nicht vollständig von Biofilm bedeckt war, war dieser Effekt von Re-

levanz. Eine vollständige Biofilmbedeckung diene als isolierende Schicht zwischen dem in der Flüssigphase gelösten Sauerstoff und der Arbeitselektrode. Diese Isolierung bewirkte eine merklich geringere Sauerstoffreduktion.

Für den Betrieb eines möglichst effizienten Prozesses galt es also, die Sauerstoffkonzentration in der Gasphase so einzustellen, dass die Organismen weder limitiert waren noch ein zu großer Sauerstoffüberschuss bestand, welcher Wachstums- und Effizienzeinbußen bedeuten würde. Die Sauerstoffkonzentration musste also dem Verbrauch der Mikroorganismen angepasst werden. Dieser Verbrauch veränderte sich mit steigender Biofilmdicke und je nach angelegtem Potential. Ein höheres Potential bedeutete eine stärkere Wasserstoffentstehung, welche das Biofilmwachstum begünstigte. Um all diese Effekte bestmöglich abbilden zu können, wurde eine eindimensionale Modellierung des Systems in COMSOL Multiphysics erstellt.

3.3.1 Modellierung des Prozesses in COMSOL

Für die Modellierung wurde ein eindimensionaler Ausschnitt des Biofilms betrachtet. Das Prinzip basiert auf dem Modell von Korth und Kolleg:innen (2015), wurde jedoch stark vereinfacht. Die Diffusionsprofile von Wasserstoff, entstehend an der Kathode, und Sauerstoff, welcher über die Flüssigphase bereitgestellt wurde, wurden über die Dicke des Biofilms berechnet. Basierend auf der lokalen Konzentration dieser beiden Substrate im Biofilm konnte die positionsabhängige Biomasse-Bildungsrate bestimmt werden. Kohlenstoffdioxid lag als Substrat im Überschuss vor, weshalb es für die Modellierungen nicht berücksichtigt wurde. Die Biofilmdicke in der Modellierung wurde manuell eingestellt und somit an das jeweils aktuelle Wachstumsstadium angepasst. Ein Beispiel für den Verlauf der Diffusionsprofile über den Biofilm bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen ist in Abb. 10 dargestellt.

Anhand dieser Modellierung konnte nun für jedes Potential und für jede Biofilmdicke der mikrobielle Sauerstoffbedarf ermittelt werden. Hierfür wurde zunächst über das Gesetz von Henry (Henry und Banks, 1803) die Gelöstsauerstoffkonzentration im Medium bei Einstellen eines bestimmten Sauerstoffanteils in der Gasphase berechnet. Anhand einer Parametervariation konnte nun die optimale Sauerstoffkonzentration ermittelt werden. Diese lag vor, wenn der zur Verfügung gestellte Sauerstoff nach Diffusion über den Biofilm mit Erreichen der Arbeitselektrode nahezu vollständig verbraucht war. In Abb. 10 A ist beispielhaft dargestellt, wie dieser Zustand an den Ergebnissen der Modellierung abgelesen werden kann. In Abb. 10 B hingegen war die Sauerstoffkonzentration zu hoch eingestellt, so dass ein großer Teil die Arbeitselektrode unverbraucht erreichte, was zu Energieverlusten führte.

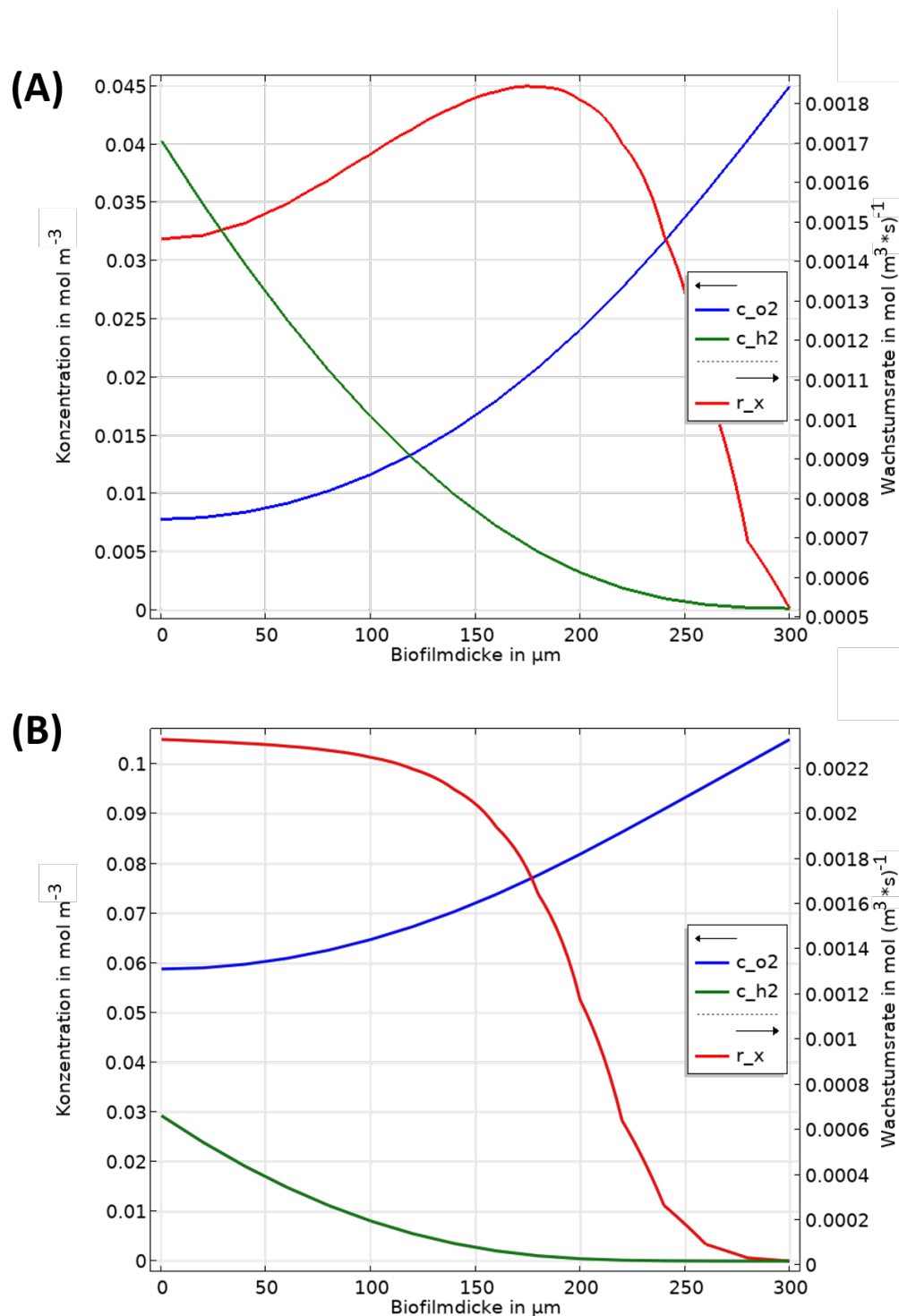


Abbildung 10: Modellerte Konzentrationsprofile von Wasserstoff und Sauerstoff im Biofilm. Die Wasserstoffentstehungsrate entspricht derjenigen bei einem Potential von -500 mV vs. SHE. Die Sauerstoffkonzentration in der Gasphase wurde auf 2,5 vol-% (A) bzw. 6 vol-% (B) eingestellt. Die Biofilmdicke wurde auf 300 μm festgelegt. Die rote Kurve beschreibt die Biomasse-Bildungsrate an der jeweiligen Stelle des Biofilms.

In der Praxis wurde die Sauerstoffkonzentration in der Gasphase daraufhin dementsprechend so eingestellt, dass die gelöste Sauerstoffkonzentration direkt an der Kathode nahezu null war. Die Konzentration des gelösten Sauerstoffs in der Flüssigphase konnte über die Sauerstoff-Sensorspots überwacht werden.

3.3.2 Coulomb'sche Effizienz

Die Coulomb'sche Effizienz (CE) beschreibt, welcher Anteil der zur Verfügung gestellten Elektronen tatsächlich für den mikrobiellen Aufbau von Biomasse verwendet wird (Das und Ghangrekar, 2018). Sie ist also ein Maß, um die Elektronenverluste im System zu beschreiben. Um die Coulomb'sche Effizienz zu berechnen, musste zunächst bestimmt werden, wie viele Mol Elektronen für den Aufbau eines Mols Biomasse benötigt wurden.

Theoretisch werden für die Reduktion eines Mols CO_2 zu Biomasse 4,5 Mol Elektronen benötigt. Dies liegt daran, dass der Kohlenstoff im CO_2 eine Oxidationsstufe von +4 hat, die in der Biomasse auf -0,5 reduziert werden muss. Als zugrundeliegende Summenformel für Biomasse wurde $\text{CH}_{1,8}\text{N}_{0,18}\text{O}_{0,38}$ gewählt (McKinlay und Harwood, 2011). Für *Kyrpidia spormannii* wird eine Wasserstoff-übermittelte Elektronenübertragung postuliert (Jung, 2020). Das bedeutet, dass Wasserstoff im bioelektrochemischen System als alleiniges Elektronenshuttle dient. Bei Betrachtung der molaren Gas-Verbrauchsrate wäre somit theoretisch eine H_2 -Verbrauchsrate von 2,25 im Verhältnis zur CO_2 -Verbrauchsrate zu erwarten. Das tatsächliche H_2/CO_2 -Verhältnis muss jedoch höher sein. Das liegt an dem katabolischen H_2 -Verbrauch, der erforderlich ist, um genügend ATP zu erzeugen, damit der Kohlenstoff aus CO_2 als Biomasse integriert werden kann. Für den metabolisch verwandten Organismus *Cupriavidus necator* wurde das thermodynamische Limit für lithoautotrophes Wachstum mit 2,4 mol H_2 pro mol CO_2 bestimmt (Yu et al., 2013; Lu und Yu, 2017). Das tatsächliche H_2/CO_2 -Verhältnis für *K. spormannii* EA-1 wurde im Rahmen dieser Arbeit in einer Gasfermentation bestimmt. Es lag bei 7,5 mol H_2 pro mol CO_2 . Für den eng verwandten Stamm *Kyrpidia spormannii* FAVT5 wurde kürzlich eine ähnliche H_2/CO_2 -Rate von 7,14 mol mol⁻¹ ermittelt (Hogendoorn et al., 2020).

Mit der Bestimmung des Elektronenbedarfs konnte nun die Coulomb'sche Effizienz der oMES-Prozesse bestimmt werden. Hierbei wurde zumeist der Verlauf der CE über die Zeit berechnet. So konnten neben der Endpunktanalyse auch Aussagen über die CE im Zusammenhang mit der Entwicklung des Biovolumens oder des Bedeckungsgrades getroffen werden. In Abb. 11 ist der Verlauf der Coulomb'schen Effizienz für einen Biofilmaufwuchs bei -500 mV vs. SHE zu sehen. Der Prozess, welcher bei -500 mV vs. SHE betrieben wurde, startete mit einer Coulomb'schen

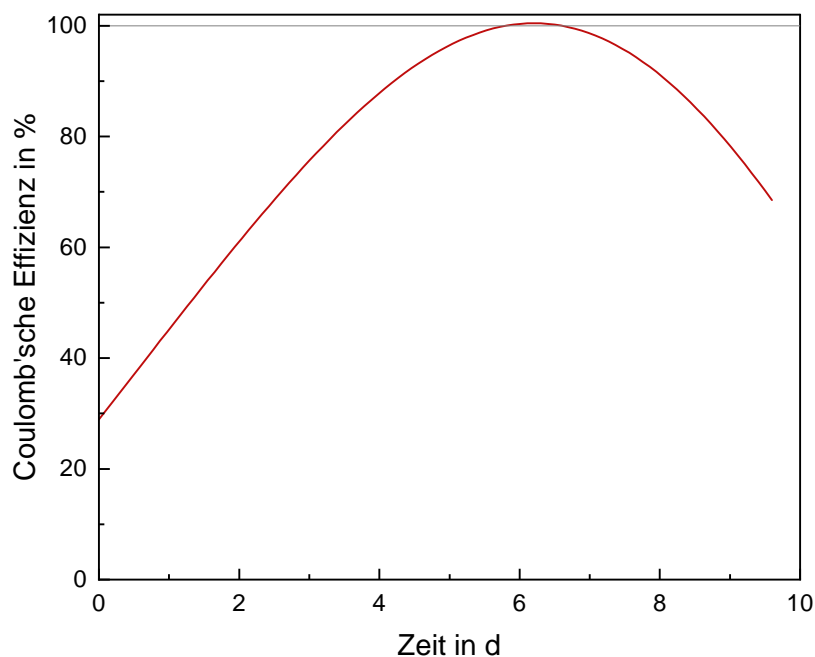


Abbildung 11: Coulomb'sche Effizienz des Prozesses. Dargestellt ist der Verlauf der Coulomb'schen Effizienz über den vollen Zeitraum der Kultivierung. Als Potential wurden -500 mV vs. SHE angelegt.

Effizienz von ca. 30%. Zu diesem Zeitpunkt gingen also ca. 70% der zur Verfügung gestellten Elektronen in abiotischen Nebenreaktionen verloren. Über die Zeit stieg die CE jedoch kontinuierlich an, bis sie an Tag 6 mit 100% ihr Maximum erreichte. Die vollständige Bedeckung der Elektrodenoberfläche mit Biofilm war schon ab Tag 3 erreicht. Der Prozess arbeitete etwa einen Tag bei maximaler Effizienz, ab Tag 7 nahm die CE jedoch wieder ab. Über den ganzen Prozesszeitraum hinweg konnte eine durchschnittliche Effizienz von 78,81% erreicht werden. Dies zeigt, dass dieser Prozess zur oxischen mikrobiellen Elektrosynthese mit nur geringen abiotischen Verlusten betrieben werden konnte.

3.3.3 Energiebedarf

Das Ziel des Prozesses ist die Aufwertung des Abfallproduktes CO_2 zu Biomasse unter Verwendung elektrischer Energie als Energiequelle. Der Energiebedarf dieses Prozesses kann über die angelegte Zellspannung sowie den zur Verfügung gestellten elektrischen Strom bestimmt werden. Dieser Wert wurde auf die produzierte Biotrockenmasse bezogen. Der Einfachheit halber und um eine Vergleichbarkeit zu erleichtern, erfolgte bei der Bestimmung des Energiebedarfs eine Beschränkung alleine auf diesen Parameter, also die Energie, die zur Bereitstellung der Elektronen

für die Reduktion von CO₂ in Biomasse erforderlich ist. Jeglicher zusätzlicher Energieeintrag, beispielsweise für den Betrieb der Prozessperipherie, wurde nicht berücksichtigt. So konnte eine Vergleichbarkeit verschiedener Technologien, von denen einige bereits deutlich höhere Technologiestandards erreicht haben als andere, sichergestellt werden. Des Weiteren wurde angenommen, dass nur die Energie und Verfügbarkeit von Elektronen die Produktivität der Biosysteme begrenzen.

Der Energiebedarf für die Produktion von 1 kg Biotrockenmasse in einem Prozess zur oxischen mikrobiellen Elektrosynthese mit *K. spormannii* lag bei 35,8 kWh (Rominger et al., 2024). Der Prozess wurde bei -500 mV vs. SHE für neun Tage betrieben. Dieser Prozess kann direkt verglichen werden mit einer zweistufigen Knallgas-Fermentation. Hierbei würde zunächst in einem externen Elektrolyseur Wasserstoff produziert werden, welcher den Organismen in einem zweiten Schritt in einer Gasfermentation zur Verfügung gestellt werden würde. Dies funktioniert für alle Knallgasbakterien, die Wasserstoff als Elektronendonator nutzen. Für *K. spormannii* wurde bereits ein Wasserstoffbedarf von 7,5 mol H₂ pro mol CO₂ bestimmt. Umgerechnet bedeutete dies einen Wasserstoffbedarf von 0,67 kg H₂ pro kg Biotrockenmasse. Ein Polymerelektrolytmembran-Elektrolyseur (PEM-Elektrolyseur), der auf dem Stand der Technik arbeitet, hat in etwa einen Energiebedarf von 50 kWh kg⁻¹ (Carmo et al., 2013; Chen et al., 2014). Es bedürfte also 33,5 kWh an Energie, um die Menge an Wasserstoff herzustellen, die stöchiometrisch für die Bildung von 1 kg Biotrockenmasse benötigt werden würde.

In der Natur ist der am häufigsten auftretende Kohlenstoff-fixierende Stoffwechselweg der reduktive Pentosephosphat-Zyklus, oder auch Calvin-Benson-Bassham-Zyklus (CBB) (Wolosiuk et al., 1993; Bar-Even et al., 2012). Dieser ist nicht nur bei zahlreichen Knallgasbakterien zu finden, sondern vor allem in der Pflanzenwelt weit verbreitet. Deshalb sollte der Energiebedarf, den verschiedene Pflanzenarten bei der Fixierung von CO₂ mithilfe des CBB-Zyklus aufweisen, mit dem der oMES verglichen werden. Ein direkter Vergleich ist hier jedoch nicht möglich, da in der Photosynthese das Sonnenlicht als Energiequelle dient. Für die oMES sowie die Knallgasfermentation wurde deshalb ein Umwandlungsfaktor von Sonnenenergie in elektrische Energie in die Berechnungen inkludiert. Dabei wurde die Umwandlung des Sonnenlichts in elektrische Energie mittels einer Photovoltaik-Anlage angenommen. Für monokristalline Silizium-Solarzellen liegt die Umwandlungseffizienz von Sonnenenergie in elektrische Energie bei maximal 17,5 % (Venkateswari und Sreejith, 2019). Deshalb wurden die Werte für den elektrischen Energiebedarf der oxischen mikrobiellen Elektrosynthese und der Gasfermentation mit einem Faktor von 5,714 multipliziert. So konnte der Sonnenenergiebedarf ermittelt werden. Die Werte wurden mit dem

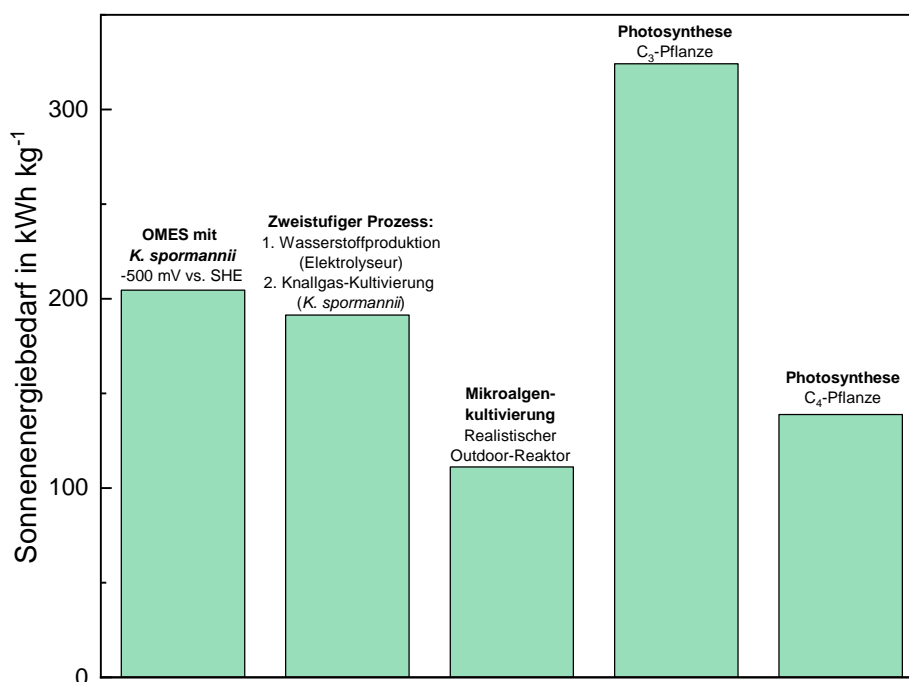


Abbildung 12: Sonnenenergiebedarf von Biomasse-produzierenden Prozessen. Der Energiebedarf der oxischen mikrobiellen Elektrosynthese mit *K. spormannii* bei -500 mV vs. SHE in kWh kg⁻¹ wurde mit einem zweistufigen Prozess verglichen, bei welchem in einem ersten Schritt der benötigte Wasserstoff mithilfe eines Elektrolyseurs hergestellt wurde. In einem zweiten Schritt wurde dann eine Gasfermentation von *K. spormannii* angenommen. Des Weiteren wurde der Energiebedarf einiger pflanzlicher Photosynthesereaktionen (C₃-Pflanze, C₄-Pflanze und Mikroalgen) in den Vergleich mit aufgenommen. Für die oMES sowie den zweistufigen Prozess zur Gasfermentation wurde eine Konversion der Sonnenenergie in elektrische Energie mittels Photovoltaik angenommen.

Sonnenenergiebedarf für die Produktion von Pflanzenbiomasse für C₃-Pflanzen, C₄-Pflanzen und Mikroalgen verglichen. Die Daten sind in Abb. 12 dargestellt.

Der Brennwert von Pflanzenbiomasse wurde mit 4,86 kWh kg⁻¹ Biotrockenmasse angenommen (Lieth und Whittaker, 1975). Bei einer durchschnittlichen Umwandlungseffizienz von Sonnenlicht in Biomasse von 1,5 % (C₃-Pflanze) bzw. 3,5 % (C₄-Pflanze) (Éva et al., 2019) entspricht das einem Sonnenenergiebedarf von 324,1 kWh (C₃) bzw. 138,9 kWh (C₄) pro kg Biotrockenmasse.

Mikroalgen werden im Gegensatz zu den meisten anderen Pflanzen in speziellen Bioreaktoren kultiviert. Die Effektivität eines Photobioreaktors wird über den Photokonversions-Wirkungsgrad (Photoconversion-Efficiency, PCE) angegeben (Kaltschmitt et al., 2016). Dieser liegt zwischen 1 % für eine offene Teichwirtschaft und 10 %, was die theoretische Maximaleffizienz wäre. Für die folgende Berechnung wurde eine PCE von 5 % angenommen. Das entspricht einem realistischen Freiland-Reaktor (Kaltschmitt et al., 2016). Mikroalgenbiomasse hat in etwa einen Energiegehalt

von 20 MJ pro kg Biotrockenmasse (Wilhelm et al., 2014). Somit ergibt sich ein Sonnenenergiebedarf von 111,1 kWh pro kg Biotrockenmasse.

3.4 Voraussetzungen für den Betrieb eines kontinuierlichen Prozesses

Um einen kontinuierlichen Biofilmprozess zu betreiben, dessen Produkt die Biomasse selbst oder ein intrazelluläres mikrobielles Produkt ist, bedarf es einer kontinuierlichen Biomasseproduktion im Biofilm. Diese Biomasse kann entweder kontinuierlich oder diskontinuierlich geerntet werden (Boelee et al., 2013). Zudem muss sicher gestellt werden, dass der Prozess der Ernte sich nicht wachstumshemmend oder gar wachstumsverhindernd auf den Biofilm auswirkt. Im folgenden Abschnitt wird beschrieben, wie sowohl eine diskontinuierliche Erntemethode entwickelt wurde als auch gezeigt, dass der Biofilm sich nach der Ernte wieder regenerieren konnte. Teile der folgenden Ergebnisse wurden im Rahmen einer Vorstudie zu dieser Arbeit produziert (Rominger, 2020).

3.4.1 Ernte des Biofilms

Die Biofilme, die *K. spormannii* im beschriebenen System auf der Kathode bildete, zeigten in der Regel bis zu sieben Tage nach Eintritt in die exponentielle Wachstumsphase eine relevante Änderung der Biofilmdicke (siehe auch Abb. 7). Sobald sich die Dicke nicht weiter veränderte, war ein Gleichgewichtszustand zwischen Biomasseaufwuchs und der Ablösung von Zellen aus dem Biofilm durch Scherkräfte erreicht (Vassilev et al., 2022). Ab diesem stationären Zustand änderte sich die absolute Biomasse im Biofilm nicht mehr. Bei der diskontinuierlichen Erntemethode war also der Eintritt in die stationäre Phase der richtige Zeitpunkt für die Biomassernte. Die Methode zur Ernte basierte auf der Wasserstoffproduktion an der Kathode. Es wurde ein Potential angelegt, welches niedrig genug war, um die Produktion von Wasserstoffblasen zu induzieren. Diese Wasserstoffblasen bildeten sich unter dem auf der Kathode aufgewachsenen Biofilm. Sobald die Auftriebskraft groß genug war, lösten sich die Blasen und zerstörten dabei Teile des Biofilms, der sich über ihnen befand. Diese abgelösten Biofilmflocken wurden mit dem Fluss des Mediums aus dem System transportiert und konnten im Anschluss leicht von dem umgebenden Medium separiert werden.

In den abiotischen Charakterisierungen des Systems konnte eine makroskopische Wasserstoffent-

stehung ab einem Potential von etwa -550 mV vs. SHE beobachtet werden (siehe Kapitel 3.1). Für eine erste Charakterisierung des Ablöseverhaltens wurden die Abnahme des normalisierten Biovolumens sowie des Bedeckungsgrades mit abnehmendem Potential untersucht (Abb. 13). Das Potential wurde zwischen $-0,8\text{ V}$ und $-2,8\text{ V vs. SHE}$ schrittweise verringert, jedes Potential wurde für 2 min angelegt. Anschließend wurde je eine OCT-Aufnahme gemacht. In Abb. 13 (A) ist der direkte Zusammenhang der Abnahme des Biovolumens und des Bedeckungsgrades mit dem angelegten Potential gezeigt. Die Kurven zeigen einen nahezu linearen Zusammenhang. Insgesamt nahm das Biovolumen um 65% ab, der Bedeckungsgrad wurde auf 70% reduziert. Im Bereich zwischen $-1,0\text{ V}$ und $-1,4\text{ V vs. SHE}$ wurde der Biofilm in den OCT-Aufnahmen von einigen Wasserstoffblasen überschattet, welche an der Sichtscheibe hafteten und nicht entfernt werden konnten. Deshalb wurde der angenommene Zusammenhang in diesem Bereich mit einer gestrichelten Linie dargestellt. Die Blasen sind auch in der Draufsicht in Abb. 13 (B) deutlich zu erkennen. Des Weiteren sind in den Höhenprofilen die Löcher im Biofilm zu sehen, welche durch das Ablösen der Wasserstoffblasen entstanden sind. Die ersten Löcher sind ab einem Potential von $-1,1\text{ V vs. SHE}$ zu beobachten. Die Löcher haben in etwa einen Durchmesser von bis zu $300\text{ }\mu\text{m}$. Es ist gut zu erkennen, dass die Löcher mit sinkendem Potential sowohl in ihrer Häufigkeit als auch in der Größe zunehmen (Rominger et al., 2024).

Diese Untersuchung lieferte erste Informationen zu dem Ablöseverhalten bei bestimmten negativen Potentialen. Allerdings wurde die Ablösung des Biofilms auch durch die zuvor angelegten Potentiale und insbesondere durch die dabei bereits freigelegte Elektrodenfläche beeinflusst. Um also das Ablöseverhalten bei einem in einem elektroautotrophen Prozess natürlich aufgewachsenen Biofilm besser vorhersagen zu können, wurde eine ausführliche Statistik über das Ablöseverhalten ausgewachsener Biofilme, welche sich in der stationären Wachstumsphase befanden, angelegt. Hierfür wurde jeweils nur ein Potential zwischen $-1,4\text{ V}$ und $-3,0\text{ V vs. SHE}$ für je 2 min bzw. 4 min ($-3,0\text{ V}$) pro Biofilm angelegt. Die resultierende prozentuale Änderung im Biovolumen und im Bedeckungsgrad wurde über OCT-Aufnahmen bestimmt. Der Zusammenhang ist in Abb. 14 dargestellt.

Alle Daten wurden in experimentellen Triplikaten bestimmt. Das Biovolumen nahm bei einer Behandlung des Biofilms mit $-1,4\text{ V}$ für 2 min um 10% ab. Mit sinkendem Potential erhöhte sich die Abnahme. Der Trend bestätigte sich bis $-2,8\text{ V vs. SHE}$. Bei $-3,0\text{ V vs. SHE}$ war die Abnahme des Biovolumens vergleichbar zu $-2,8\text{ V}$. Ein ähnliches Verhalten war beim Bedeckungsgrad zu beobachten. Allerdings nahm der Bedeckungsgrad nicht nur zwischen $-1,4\text{ V}$ und $-2,8\text{ V vs. SHE}$

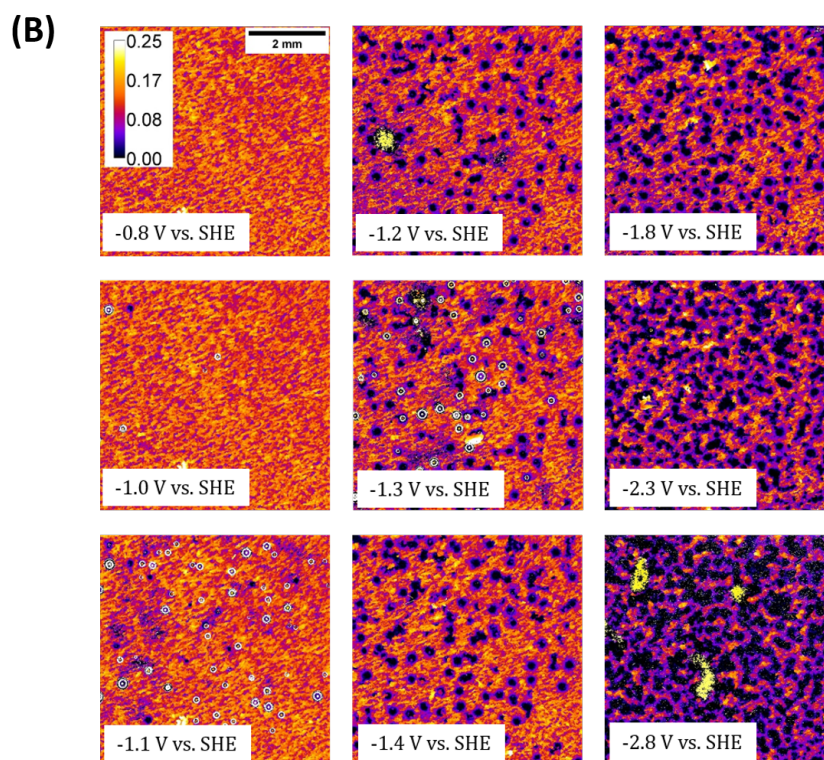
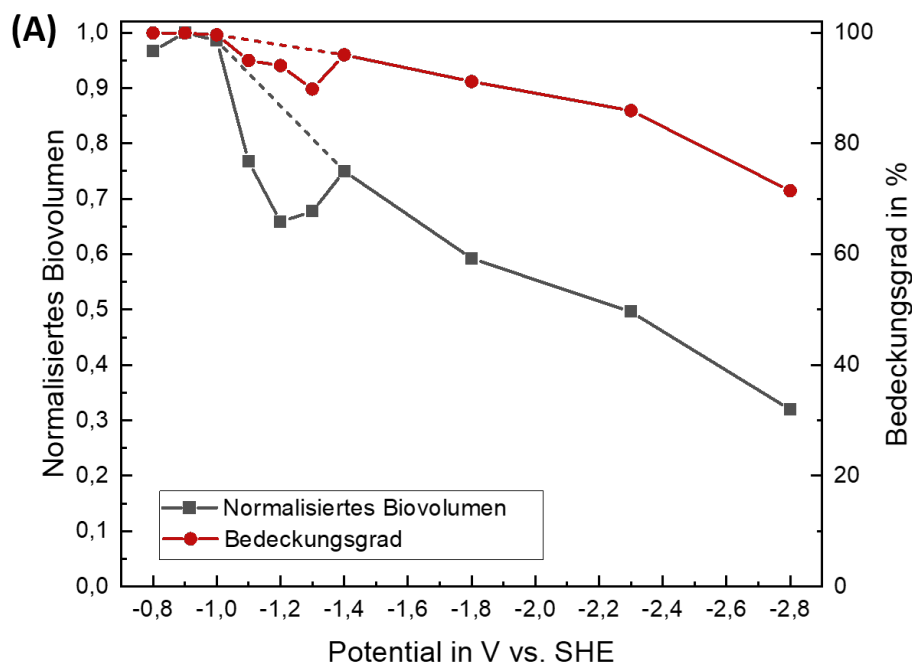


Abbildung 13: Abnahme des Biovolumens und der Oberflächenbedeckung mit abnehmendem Potential für die Biofilmernte. (A) Das Potential an der Arbeitselektrode wurde zwischen $-0,8\text{ V}$ und $-2,8\text{ V}$ vs. SHE schrittweise verringert. Jedes Potential wurde für 2 min angelegt, anschließend wurde eine OCT-Aufnahme gemacht. Das normalisierte Biovolumen (grau) und der Bedeckungsgrad (rot) wurden bestimmt. (B) Höhenprofile des Biofilms während des Ablöseprozesses. Die Daten in der Farblegende sind in mm angegeben. Die Abbildung wurde leicht abgewandelt aus Rominger (2020) übernommen.

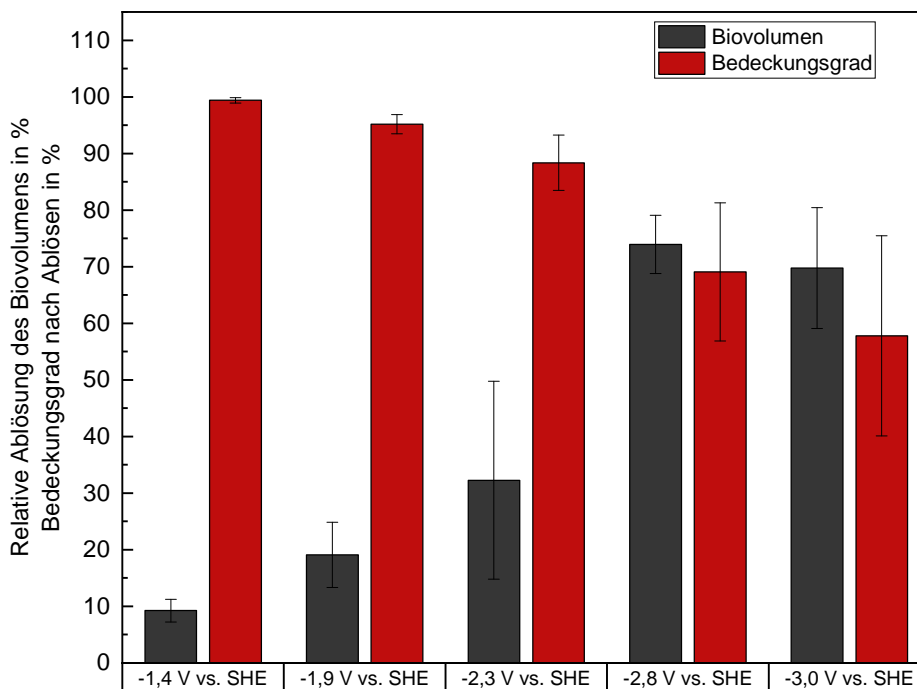


Abbildung 14: Ablöseverhalten von natürlich gewachsenen Biofilmen im stationären Zustand. Die grauen Balken zeigen die relative Änderung des Biovolumens in Prozent nach Anlegen eines negativen Potentials. Die roten Balken zeigen die Abnahme des Bedeckungsgrades in Prozent. Das Potential wurde für jeweils 2 min (-1,4 V, -1,9 V, -2,3 V, -2,8 V) bzw. 4 min (-3,0 V) angelegt. Alle Daten wurden in Triplikaten aus OCT-Aufnahmen bestimmt. Die Standardabweichung wurde angegeben.

SHE ab, auch nach der Behandlung bei -3,0 V vs. SHE reduzierte sich die Elektrodenbedeckung nochmals im Vergleich zu -2,8 V vs. SHE.

Bei der Ernte eines Biofilms sollte das Biovolumen weitestgehend reduziert werden, während der Bedeckungsgrad so hoch wie möglich bleiben sollte. So könnte die größte Menge an Biomasse geerntet und gleichzeitig für den darauffolgenden Wiederaufwuchs des Biofilms sichergestellt werden, dass möglichst wenige reaktive Sauerstoffspezies (ROS) an der Kathode entstehen würden. Deshalb wurde anhand dieser Daten entschieden, zukünftige Biofilme für 2 min einem Potential von -2,8 V vs. SHE auszusetzen. So konnte eine Ernte von ca. 75 % des Biovolumens erreicht werden, während die Elektrodenbedeckung nur auf ca. 70 % reduziert wurde.

3.4.2 Wiederaufwuchs des Biofilms nach der partiellen Ernte

Für den Betrieb eines kontinuierlichen Prozesses war es notwendig zu zeigen, dass der nach der Ernte zurückbleibende Biofilm sich wieder zu großen Teilen regenerieren konnte. Hierfür wurde ein bei -500 mV vs. SHE gewachsener Biofilm für 2 min einem Potential von -2,8 V vs. SHE

ausgesetzt. Im Anschluss wurde über die folgenden zehn Tage der sogenannte Wiederaufwuchs bei einem Potential von -500 mV mithilfe der OCT beobachtet (Abb. 15).

Das Biovolumen wurde während des Ablösevorgangs um 70 % reduziert, der Bedeckungsgrad nach der Ernte lag bei 70 %. Über die folgenden zehn Tage konnte eine Regeneration des Biofilms auf 70 % des Biovolumens vor der Ernte beobachtet werden. Zu diesem Zeitpunkt wurde das Experiment beendet. Es zeichnete sich jedoch noch kein Eintritt in die stationäre Phase ab. Die Arbeitselektrode war bereits nach etwa sieben Tagen wieder vollständig bedeckt. In Teil (B) der Abbildung ist zu sehen, wie sich die durch die Ernte hervorgerufenen Löcher im Biofilm bereits nach drei Tagen deutlich und nach zehn Tagen vollständig schlossen. Zudem fällt auf, dass sich auch Biofilmstrukturen, welche nicht vom Ablösevorgang betroffen waren, im Wiederaufwuchs weiter vergrößerten (rechte Markierung).

3.5 Mikrobiologische Produkte

Im Gegensatz zur anoxischen mikrobiellen Elektrosynthese können bei der oMES tendenziell länger-kettige, komplexere Produkte hergestellt werden (Pous et al., 2022; Langsdorf et al., 2024; Pillot et al., 2022b). Das liegt daran, dass Sauerstoff als Elektronenakzeptor ein höheres Redoxpotential hat als alternative Elektronenakzeptoren, welche bei der anoxischen mikrobiellen Elektrosynthese zum Einsatz kämen - meist Kohlenstoffdioxid. Dadurch steht den Mikroorganismen mehr Energie zur Verfügung, welche für die Produktion von Biomasse oder anderen komplexen Produkten verwendet werden kann. Zu diesen Produkten gehört in erster Linie die mikrobielle Biomasse selbst. Einige Studien haben bereits untersucht, inwiefern elektroautotroph gewachsene Biomasse als Nahrungsergänzungsmittel, insbesondere im Hinblick auf mikrobielles Protein, genutzt werden kann (Mishra et al., 2020; Marcellin et al., 2022; Pous et al., 2022). Auch für *Kyrpidia spormannii* wurde der Proteingehalt in der Biomasse bestimmt. Zudem ist *K. spormannii* unter bestimmten Bedingungen in der Lage, ein intrazelluläres Speicherpolymer in relevanten Mengen zu produzieren. Dessen Produktion wurde ebenfalls untersucht.

3.5.1 Mikrobielles Protein

Der Proteingehalt der Biomasse von *K. spormannii* wurde mittels der Methode zum Proteinnachweis nach Bradford gemessen (Bradford, 1976). Der Proteingehalt wurde sowohl für heterotroph als auch für elektroautotroph gewachsene Biomasse bestimmt. Bei heterotroph gewachsener Bio-

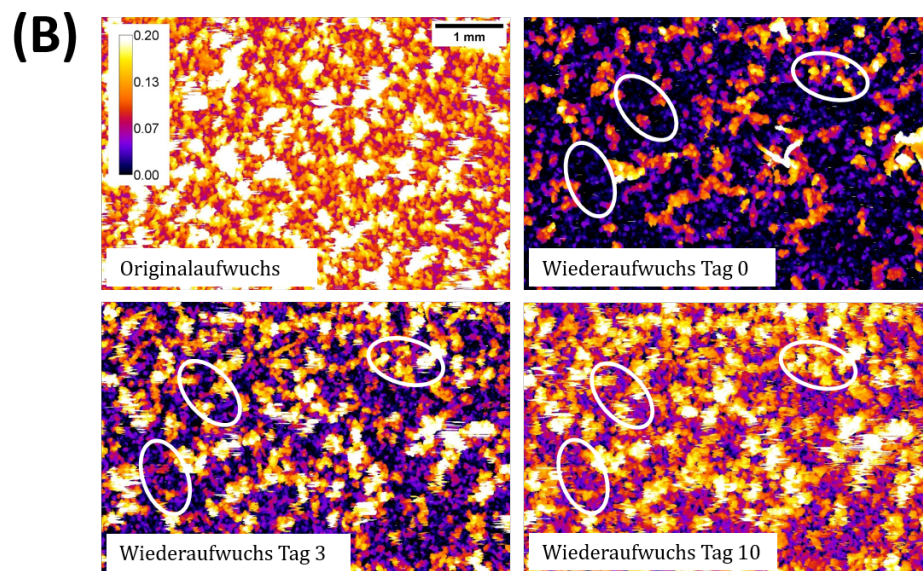
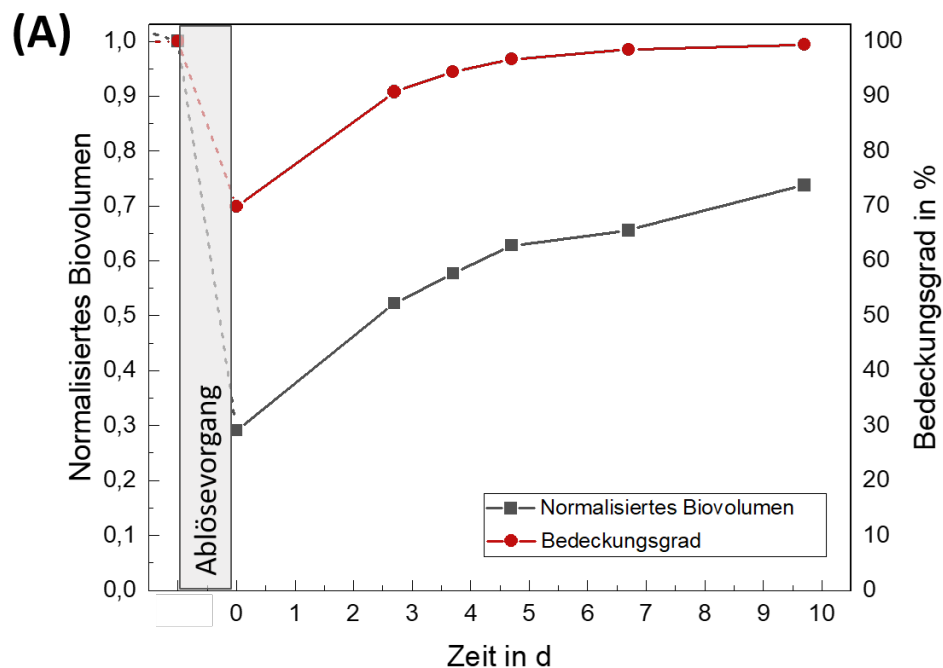


Abbildung 15: Wiederaufwuchs des Biofilms nach einer partiellen Ernte. (A) Verlauf des normalisierten Biovolumens (grau) sowie des Bedeckungsgrades (rot) während des Erntevorgangs und den darauffolgenden zehn Tagen der Kultivierung bei -500 mV vs. SHE . (B) Höhenprofile des Biofilms vor der Ernte, direkt danach sowie nach drei und zehn Tagen des Wiederaufwuchses. Die beiden linken Kreise markieren Löcher im Biofilm, die durch die Ernte entstanden sind. Der dritte Kreis markiert eine Biofilmstruktur, welche vom Ablösevorgang nicht betroffen war. Die Farblegende ist in mm angegeben. Die Abbildung wurde leicht abgewandelt aus Rominger (2020) übernommen.

masse lag der Proteingehalt bei $0,5682 \text{ mg mg}^{-1}$ Biotrockenmasse. Ein Biofilm, welcher elektroautotroph gewachsen war, bestand zu $0,6192 \text{ mg mg}^{-1}$ Biotrockenmasse aus Protein.

In einer bei AltaBioscience in Auftrag gegebenen Analyse der Aminosäuren wurde ein Aminosäuregehalt von $14,3 \text{ g pro } 100 \text{ g}$ Biomasse ermittelt. Die Analytik wurde mit frischer, feuchter Biomasse durchgeführt. Die Konzentrationen der einzelnen Aminosäuren sind in Tabelle 9 aufgelistet. Unter diesen 20 Aminosäuren gehören Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin,

Tabelle 9: Aminosäuren-Zusammensetzung für *K. spormannii*. Die Analyse wurde von AltaBioscience (UK) durchgeführt.

Aminosäure	Menge in g/100 g
Cysteinsäure	0,553
Hydroxyprolin	-
Asparaginsäure	1,37
Threonin	0,867
Serin	0,551
Glutaminsäure	1,72
Prolin	0,64
Glycin	0,704
Alanin	0,987
Cystin	0,0831
Valin	1,16
Methionin	0,365
Isoleucin	0,73
Leucin	1,28
Tyrosin	0,492
Phenylalanin	0,604
Histidin	0,271
Tryptophan	0,222
Lysin	0,764
Arginin	0,963
Gesamt	14,3

Phenylalanin, Threonin, Tryptophan und Valin zu den neun essentiellen Aminosäuren, welche nicht von Säugetieren synthetisiert werden können (Hou und Wu, 2018). An der Gesamtheit der Aminosäuren in *K. spormannii* machen diese einen Anteil von $40,9 \text{ mol-}\%$ aus.

3.5.2 Mikrobielles Speicherpolymer

Neben den Aminosäuren sollte noch ein weiteres mikrobielles Produkt untersucht werden. Es ist bekannt, dass *Kyrrpidia spormannii* ein mikrobielles Speicherpolymer aus der Gruppe der Polyhydroxyalkanoate produzieren kann (Reiner et al., 2020; Pillot et al., 2022a). Die Produktion dieses Speicherpolymers tritt insbesondere unter Nährstoffmangel auf, beispielsweise der Limitierung

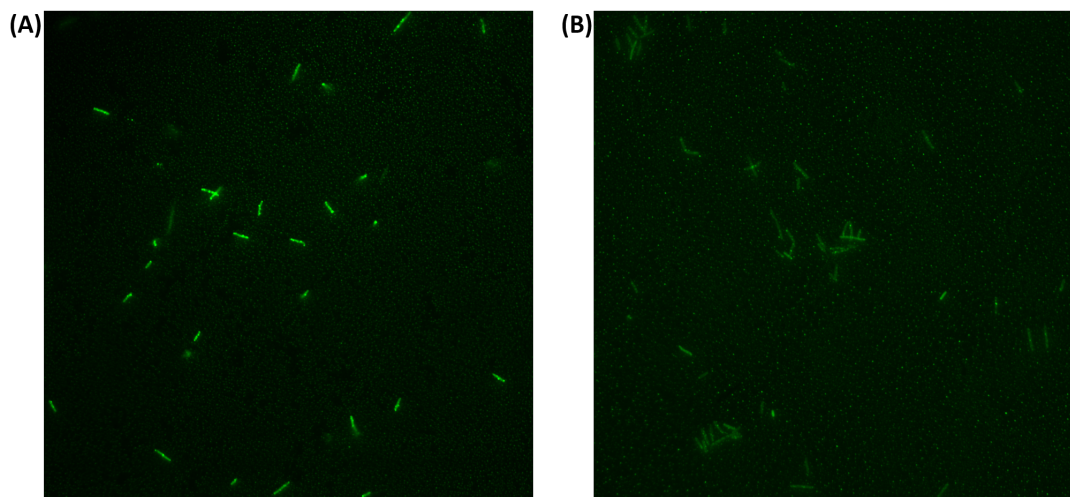


Abbildung 16: Qualitativer Nachweis eines mikrobiellen Speicherpolymers mit dem Fluoreszenzfarbstoff LipidGreen2. Die intrazellulären Speicherpolymere leuchten in hellem Grün. (A) Autotrophe Aufzucht der Biomasse unter Stickstoff- und Phosphorlimitierung; (B) Heterotrophe Aufzucht der Biomasse.

von Stickstoff und Phosphor. Diese Art der Nährstofflimitierung unter gleichzeitigem Vorhandensein einer Kohlenstoffquelle soll die Akkumulation mikrobieller Speicherstoffe induzieren. Solange die für das Zellwachstum notwendigen Nährstoffe nicht vorhanden sind, lagern die Organismen den Kohlenstoff in intrazellulären Granula, den Speicherpolymeren (Zhang et al., 2022). Deshalb wurde, neben der Produktion des Speicherpolymers unter heterotrophen Bedingungen, auch die Produktion bei autotrophen Wachstumsbedingungen unter Nährstofflimitierung untersucht. Sowohl für heterotrophe als auch für autotrophe Kultivierung unter Nährstofflimitierung konnte nach Anfärben der Zellen mit LipidGreen2 mittels Fluoreszenzmikroskopie die Akkumulation des Speicherpolymers qualitativ nachgewiesen werden (Abb. 16). Die angefärbten Granula erschienen dabei in hellem Grün fluoreszierend, während die Zellen selbst nur ein leicht grünes Hintergrundsignal abgaben. Bei dieser rein qualitativen Analyse war deutlich zu erkennen, dass die Zellen, welche unter autotrophen Bedingungen und Nährstofflimitierung aufwuchsen, eine stärkere Produktion der Granula des Speicherpolymers aufwiesen als die Zellen unter heterotropher Aufzucht.

Für eine anschließende Identifizierung des Speicherpolymers erfolgte zunächst die Extraktion der Granula aus den Zellen mittels Chloroform. Der Extrakt aus autotropher Kultivierung wurde hinsichtlich seiner elementaren Zusammensetzung in Bezug auf Kohlenstoff (C), Stickstoff (N), Wasserstoff (H) und Schwefel (S) untersucht. Es wurden sowohl der Extrakt als auch ein P3HB-Standard analysiert (Tab. 10). Hierbei wurde festgestellt, dass sich die Elementarzusammensetzung des Extraktes stark von der des P3HB-Standards unterschied. Während P3HB bei-

Tabelle 10: Elementarzusammensetzung des Extraktes aus autotropher Kultivierung. Die Probe wurde hinsichtlich ihres Kohlenstoff-, Stickstoff-, Wasserstoff- und Schwefelanteils untersucht. Zum Vergleich diente Poly-(3)-Hydroxybuttersäure als Standard. Die Zusammensetzung wurde in Triplikaten bestimmt. Die Analyse wurde in der zentralen Elementanalytik der Universität Hamburg durchgeführt.

Probe	Kohlenstoff (C)	Stickstoff (N)	Wasserstoff (H)	Schwefel (S)
Extrakt	16,91 % ± 4,44 %	3,22 % ± 1,83 %	3,14 % ± 0,63 %	0,32 % ± 0,07 %
P3HB	55,70 % ± 0,08 %	0,29 % ± 0,02%	7,00 % ± 0,06 %	0,03 % ± 0,03 %

spielsweise einen Kohlenstoffanteil von 55,70 % aufwies, lag der C-Anteil des Extraktes im Mittel nur bei 16,91 %. Dafür waren im Extrakt sowohl Schwefel als auch Stickstoff im Vergleich zu P3HB übermäßig vorhanden. Der P3HB-Standard enthielt mit 7,0 % einen mehr als doppelt so hohen Wasserstoffanteil wie der untersuchte Extrakt.

Für eine weitergehende Untersuchung der Struktur des Extraktes wurde eine Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) durchgeführt. Das Produkt wurde anschließend an die Extraktion nicht gefällt, sondern in Lösung analysiert. Auch erfolgte die Extraktion des Speicherpolymers mit deuteriertem Chloroform, da dieses, im Gegensatz zu protoniertem Chloroform, nicht NMR-aktiv ist. Jedoch war das deuterierte Chloroform nur zu 99,8 % deuteriert, die restlichen 0,2 % des verwendeten Chloroforms konnten also weiterhin ein NMR-Signal hervorrufen. Dieses Signal wurde für die Auswertung mithilfe der Software unterdrückt, um so das eigentliche Signal des Extraktes stärker hervorzuheben. Das aufgenommene zweidimensionale TOCSY-Spektrum für den Extrakt aus heterotroph gewachsener Biomasse ist in Abb.17 gezeigt. Bei etwa 5,4 ppm im ^1H -Spektrum auf der x-Achse wird eine Reihe von Signalen bei etwa 1,3 ppm, 2,0 ppm und 5,5 ppm auf der y-Achse aufgezeichnet. Diese können charakteristisch für die Struktur von Poly-3-Hydroxybuttersäure sein.

Für die Analyse auf der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) wurde der Extrakt zunächst einer sauren Hydrolyse in konzentrierter Schwefelsäure unterzogen. Ebenso wurde der P3HB-Standard in sein Monomer Crotonsäure gespalten. Dieses konnte auf der HPLC nach 27 min bei 210 nm nachgewiesen werden. Auch der hydrolysierte Extrakt wies, sowohl bei heterotropher als auch bei autotropher Kultivierung, einen Peak nach 27 min auf. Jedoch war die detektierte Menge so gering, dass sie nicht quantifiziert werden konnte.

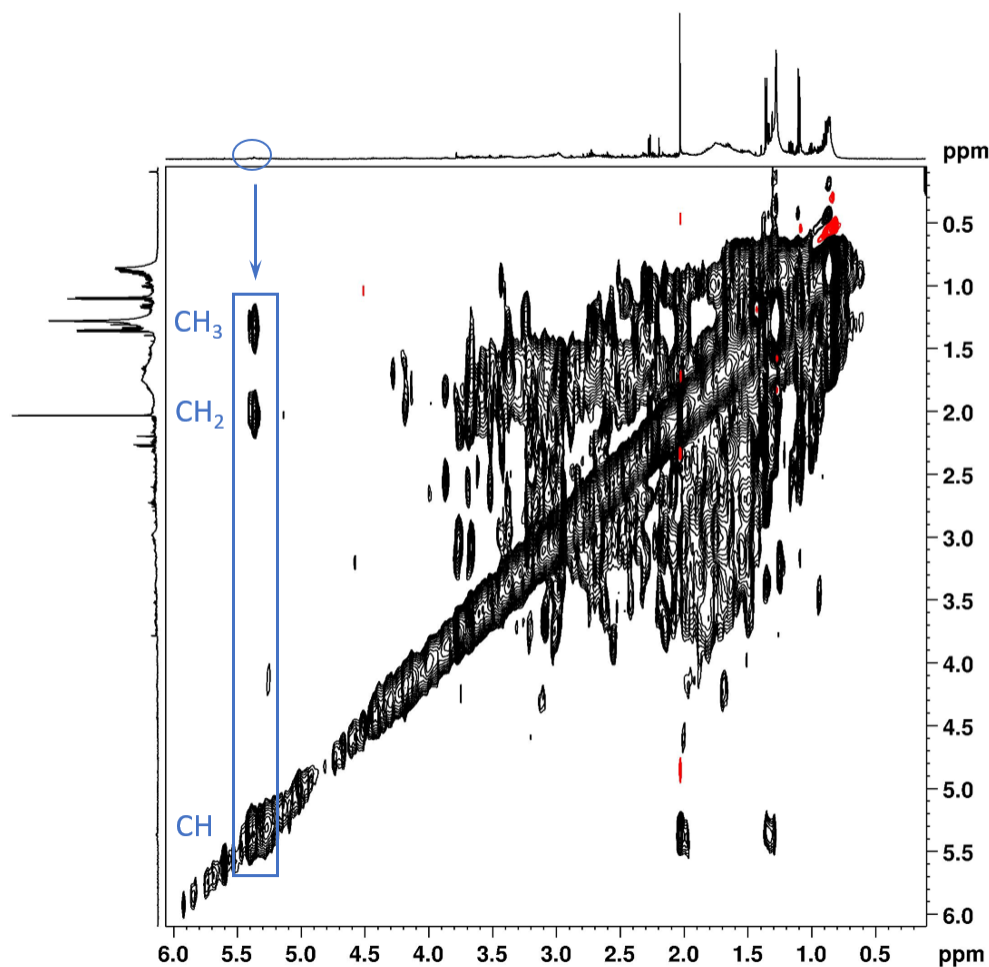


Abbildung 17: NMR-Spektrum für den Extrakt aus heterotroph gewachsener Biomasse. Es wurde ein zweidimensionales TOCSY-Spektrum aufgenommen. Die markierten Signale sind charakteristisch für Poly-3-Hydroxybuttersäure.

3.6 Einfluss der Zugabe eines funktionalisierten Polymers auf das Biofilmwachstum

Für *Escherichia coli* konnte gezeigt werden, dass die Zugabe eines funktionalisierten Polymers einen positiven Einfluss auf die Biofilmbildung hatte (Adoni et al., 2022). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Zugabe des Polymers zu *K. spormannii*-Kulturen einen ähnlichen Effekt bewirken würde. Das Polymer wurde durch Funktionalisierung mit einem Aldehyd jeweils mit einer Eigenschaft versehen. Die zwölf Aldehyde (s. Kapitel 2.5) lassen sich, basierend auf ihren Eigenschaften, in folgende Gruppen einteilen: Aliphatische Aldehyde (G, H, K, L), aromatische Aldehyde (A, B, E, F, J) und heterozyklische Aldehyde (C, D, I). Aufgrund ihrer unterschiedlichen Eigenschaften haben all diese Aldehyde jeweils eine andere Wechselwirkung mit den Zellen. Um zu untersuchen, ob sich einige davon positiv auf das Biofilmwachstum auswirken, wurde eine mehrtägige Kultivierung gestartet. Zu den Zellkulturen wurde jeweils das

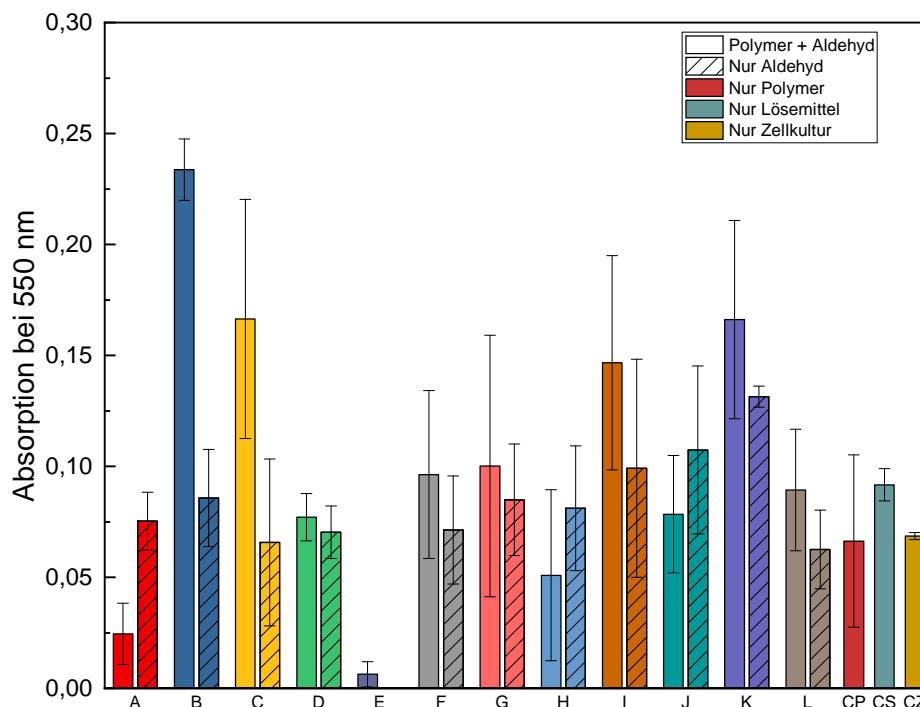


Abbildung 18: Beurteilung der Biofilmbildung mittels Kristallviolett. Die Zellkulturen wurden wie beschrieben mit dem Polymer inkubiert, das je mit einem Aldehyd funktionalisiert war (Unschraffierte Säulen A-L). Als Kontrolle wurden nur das jeweilige Aldehyd (schraffierte Säulen A-L), nur das Polymer (CP), nur die Lösemittel (CS) bzw. nichts (CZ) zu den Zellkulturen zugegeben. Nach 92 h wurden die Biofilme mit Kristallviolett eingefärbt und die Absorption bei 550 nm gemessen. Die Untersuchungen erfolgten in Triplikaten.

mit einem der Aldehyde funktionalisierte Polymer zugegeben. Als Negativkontrollen dienten zum einen Zellkulturen, denen jeweils nur das Aldehyd ohne Polymer zugegeben wurde, und im Gegensatz dazu nur die Polymerzugabe zu einer Zellkultur, ohne Funktionalisierung mit einem Aldehyd. Außerdem wurden die Zellen für eine weitere Kontrolle nur mit den beiden Lösemitteln Essigsäure und Di-Methylsulfoxid (DMSO) versetzt, und zuletzt wurde auch eine Zellkultur ohne jede Zugabe geführt. Nach 92 h wurden die planktonischen Zellen vorsichtig ausgewaschen. Die Biofilme, welche sich an den Wänden der Wells der Mikrotiterplatte gebildet hatten, wurden mit einer Kristallviolett-Lösung angefärbt und die Absorption bei 550 nm gemessen. Je größer die Absorption war, desto mehr Biofilm hatte sich gebildet. Die gemessenen Absorptionen sind in Abb. 18 dargestellt.

Alle Ergebnisse, bei welchen die Absorption des funktionalisierten Polymers größer war als die der Kontrollen, waren interessant für weitere Untersuchungen. Das traf insbesondere auf die Aldehyde B, C, I und K zu. Für Aldehyd B war die Absorption des funktionalisierten Polymers mit $0,23 \pm 0,01$ am höchsten. Als nächstes folgte das mit dem Aldehyd K funktionalisierte Polymer

mit einer Absorption von $0,17 \pm 0,05$, wobei hier auch die Zugabe des Aldehyds alleine zu einer Absorption von $0,13 \pm 0,01$ führte. Auch das mit dem Aldehyd C funktionalisierte Polymer induzierte eine Biofilmbildung, welche zu einer Absorption von $0,17 \pm 0,05$ führte. Die Negativkontrolle lag mit $0,07 \pm 0,04$ deutlich darunter. Auch Aldehyd I wurde mit einer Absorption von $0,15 \pm 0,05$ für weitere Untersuchungen ausgewählt. Bei allen anderen Aldehyden trat keine relevante Erhöhung der Absorption bei dem funktionalisierten Polymer im Vergleich zu den Kontrollen auf, bei einigen war die Absorption sogar geringer.

Im nächsten Schritt wurde das planktonische Wachstum der Zellen, zu denen das jeweils mit B, C, I oder K funktionalisierte Polymer zugegeben wurde, untersucht. Hierfür wurde die optische Dichte bei 600 nm über einen Zeitraum von 95 h beobachtet. Die Wachstumskurven sind in Abb. 19 (A) gezeigt. Als Kontrollen dienten wiederum Zellkulturen, denen nur das jeweilige Aldehyd, nur das Polymer, nur die Lösemittel oder gar nichts zugefügt wurden (Abb. 19 (B)).

In allen Ansätzen war Wachstum zu beobachten. Da das Polymer oder auch die Aldehyde selbst eine Absorption bei 600 nm haben können, sollen im folgenden nicht die absoluten Werte, sondern die maximale Wachstumsrate μ_{max} betrachtet werden. Diese war nach einer initialen Verzögerungsphase von etwa 7 h bei der reinen Zellkultur mit $0,09 \text{ d}^{-1}$ am größten. Ein ähnlicher Wert wurde bei Zugabe der beiden Lösemittel (Essigsäure und DMSO) gemessen. Mit $0,02 \text{ d}^{-1}$ (B), $0,01 \text{ d}^{-1}$ (C), $0,04 \text{ d}^{-1}$ (I) oder $0,01 \text{ d}^{-1}$ (K) zeigten die Zellkulturen, denen das funktionalisierte Polymer zugegeben wurde, in den ersten 24 h deutlich geringeres Wachstum. Wird jedoch die Änderung der OD_{600} über den gesamten Zeitraum betrachtet, kann auch hier bis zu 72 h lang eine konstante Steigung beobachtet werden. Danach schienen die Mikroorganismen in die stationäre Phase eingetreten zu sein.

Um zu überprüfen, ob die Polymerzugabe einen schädlichen Einfluss auf die Zellen nahm, wurde im Anschluss an die eben beschriebenen Wachstumsversuche eine Lebend-Tot-Zellfärbung durchgeführt. Hierfür wurden zunächst alle Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Syto9 angefärbt. Anschließend wurden die Zellen mit Propidiumiodid inkubiert. Dieser Farbstoff färbt nur tote Zellen, indem er die perforierte Zellmembran durchdringt (Crowley et al., 2016). Der Lebendfarbstoff Syto9 wird dabei verdrängt. In Abb. 20 sind die Mikroskopaufnahmen für die Aldehyde B, C, I und K, sowie alle Negativkontrollen gezeigt.

Für die Aldehyde zeigen jeweils die Bilder in der linken oberen Ecke die lebendigen Zellen (grün gefärbt), die Bilder in der rechten oberen Ecke die toten Zellen (rot gefärbt) und die Bilder in

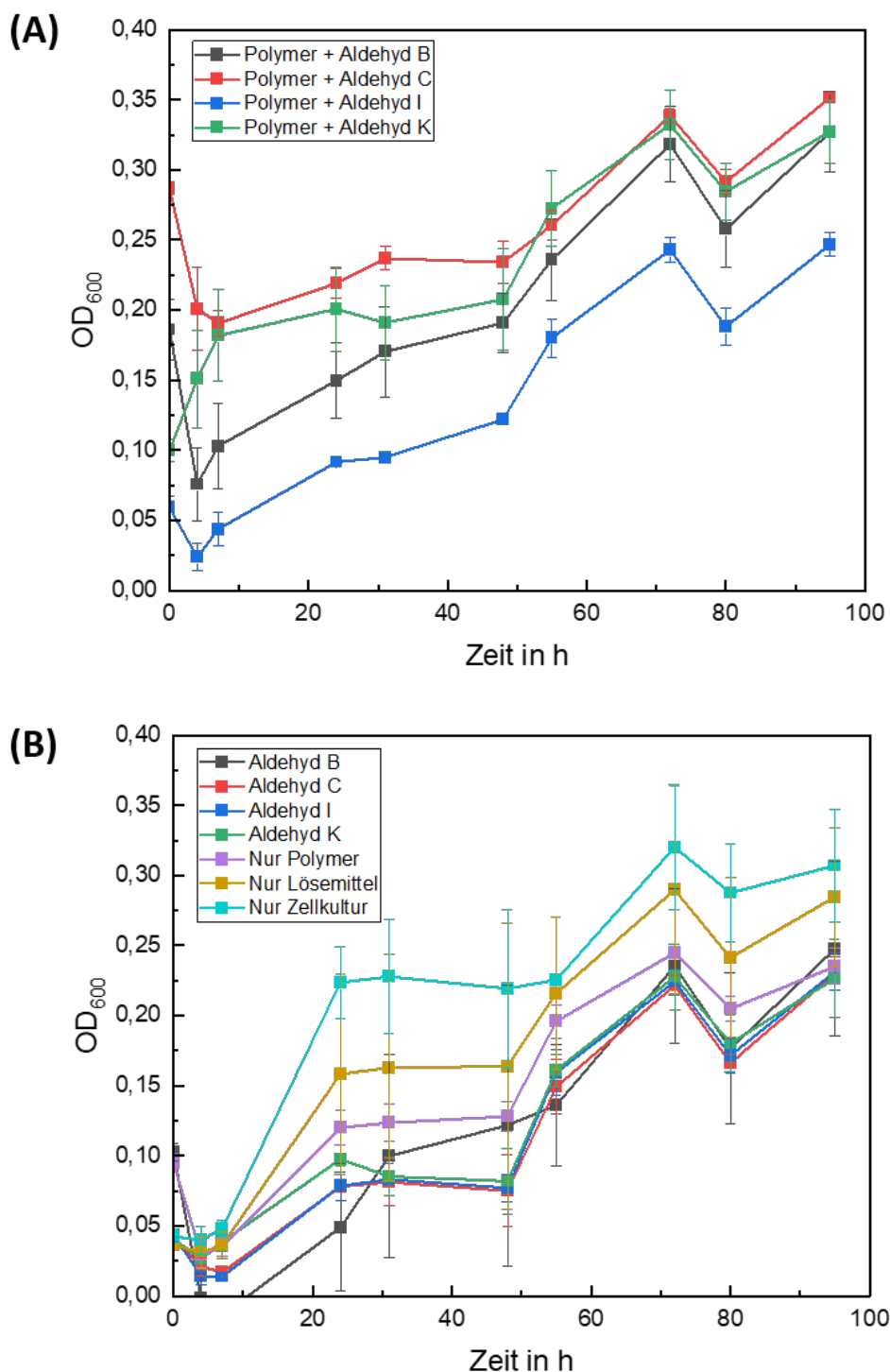


Abbildung 19: Wachstumskurven der mit Polymer + Aldehyd versetzten Zellkulturen. Die Zellkulturen wurden wie beschrieben mit dem Polymer inkubiert, das je mit einem Aldehyd funktionalisiert war. **(A)** Es wurden die Aldehyde B, C, I und K untersucht. **(B)** Als Kontrolle wurden nur das jeweilige Aldehyd, nur das Polymer, nur die Lösemittel bzw. nichts zugegeben. Über 95 h wurde die optische Dichte bei 600 nm gemessen. Die Untersuchungen erfolgten in Triplikaten.

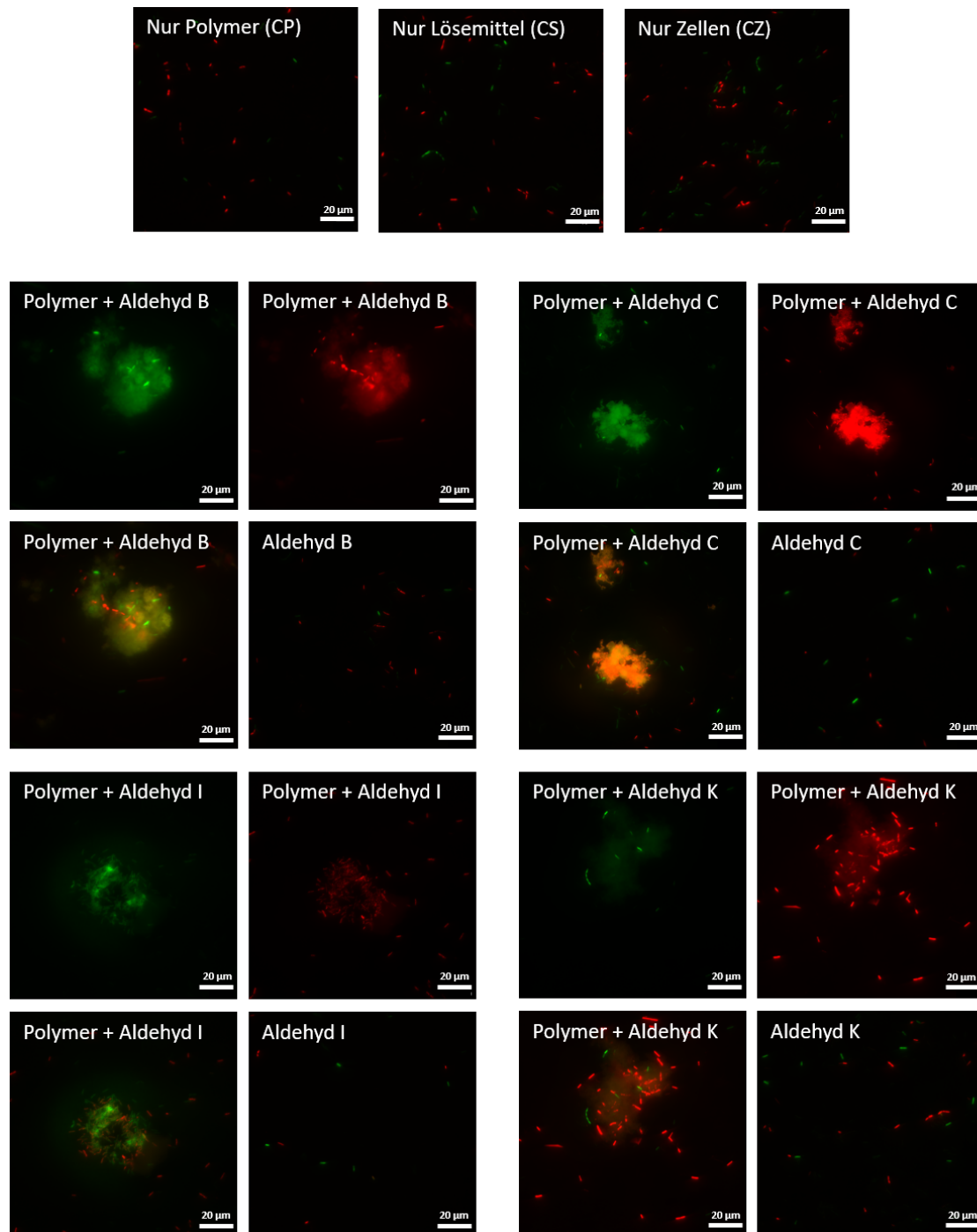


Abbildung 20: Lebend-Tot-Zellfärbung nach Biofilmwachstum mit Polymerzugabe. Das Polymer wurde jeweils mit dem Aldehyd B, C, I oder K funktionalisiert. Mit Syto9 grün gefärbte Zellen (Bilder oben links) sind lebendig, während mit Propidiumiodid rot gefärbte Zellen tot sind (Bilder oben rechts). Die Bilder in der linken unteren Ecke zeigen jeweils die Überlagerung der beiden Kanäle. Als Kontrolle wurde jeweils nur das jeweilige Aldehyd mit den Zellen inkubiert (Bilder unten rechts), außerdem wurde einmal nur das Polymer, einmal nur die beiden Lösemittel und einmal nichts zur Zellkultur zugegeben. Die Bilder wurden mit 100-facher Vergrößerung aufgenommen.

der linken unteren Ecke die Überlagerung der beiden Signale. Die Bilder in der rechten unteren Ecke zeigen die Überlagerung der Lebend- und Tot-Signale der Negativkontrollen, bei welchen nur das jeweilige Aldehyd zugegeben worden war. Die drei obersten Bilder zeigen die Negativkontrollen, bei welchen nur Polymer, nur die Lösemittel oder gar nichts zugegeben worden war. Bei der Auswertung der Mikroskopaufnahmen konnte festgestellt werden, dass sich Cluster bildeten, sobald das mit einem Aldehyd funktionalisierte Polymer vorlag. Diese Cluster traten in keiner der beschriebenen Negativkontrollen auf. Zudem war zu beobachten, dass diese Cluster bei den verwendeten Extinktions-Wellenlängen eine Autofluoreszenz zeigten, weshalb sie in den Mikroskopaufnahmen farbig erschienen. Bei dem Polymer, welches mit Aldehyd B funktionalisiert war, lagerten sich einige Zellen an dem Polymer-Aldehyd-Cluster an, ebenso bei Aldehyd I. Diese waren in beiden Fällen teils lebendig, teils tot. Aldehyd K scheint einen schädlichen Einfluss auf die Zellen zu haben, ein Großteil der angelagerten Zellen war hier nämlich tot. Bei Aldehyd C lagerten sich weder lebendige noch tote Zellen an dem Polymer-Aldehyd-Cluster an.

Eine Transkriptomanalyse sollte über mögliche Biofilm-induzierende Mechanismen auf genetischer Ebene Aufschluss geben. Hierfür wurde das Polymer, welches mit dem Aldehyd B, C oder K funktionalisiert war, jeweils zu einer Zellkultur in RR2A-Medium gegeben. Als Referenz diente eine Zellkultur, zu welcher kein Polymer gegeben wurde. Die Untersuchung wurde in Triplikaten durchgeführt. Mithilfe einer Hauptkomponentenanalyse wurden die Datensätze zunächst vereinfacht. Hierbei konnten über 65 % der Varianzen in den Datensätzen über die Hauptkomponenten 1 und 2 abgebildet werden. Die Hauptkomponentenanalyse wurde auf alle Triplikate der Transkriptome angewandt. Es konnte festgestellt werden, dass für B, K und die Referenz jeweils eines der Triplikate deutlich von den anderen beiden abwich. Das bedeutet, dass es in der Expression einiger Gene Abweichungen zwischen den Triplikaten gab. Nur für das Polymer, welches mit Aldehyd C funktionalisiert war, zeigten alle drei Triplikate ähnliche Genexpressionen. Die Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse sind in Abb. A2 dargestellt.

Die Menge aller Gene, welche in Bezug auf die Referenz um mindestens einen Faktor drei hoch- oder herunterreguliert wurde, wurde in einem Venn-Diagramm dargestellt (Abb. 21). Die betreffenden Gene sind in Tabelle A1 im Anhang aufgelistet.

In einem abschließenden Versuch sollte untersucht werden, wie sich die Zugabe des funktionalisierten Polymers in der oMES auswirkt. Hierfür wurden drei parallele Ansätze gestartet. Einem davon wurde zusammen mit den Zellen das mit Aldehyd B funktionalisierte Polymer zugegeben.

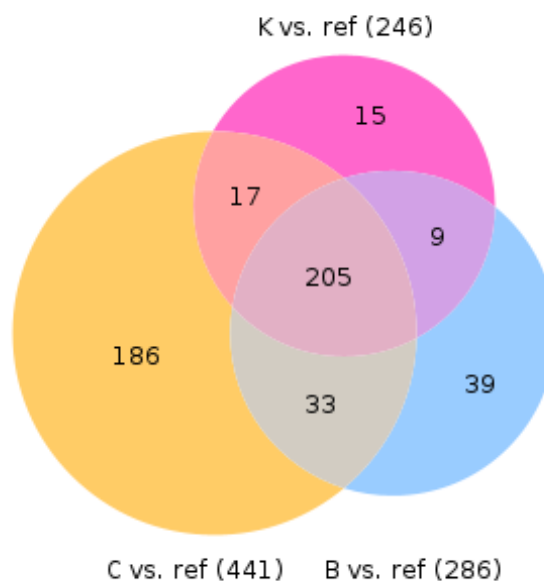


Abbildung 21: Venn-Diagramm zur Transkriptomanalyse. Es wurden alle Gene, welche im Vergleich zur Referenz um mindestens einen Faktor 3 hoch- bzw. herunterreguliert wurden, berücksichtigt.

Die anderen beiden Ansätze dienten als Negativkontrolle. In der biotischen Negativkontrolle wurden zwar Zellen, jedoch kein Polymer zugegeben. In der abiotischen Negativkontrolle wurde das funktionalisierte Polymer zugegeben, jedoch keine Zellen. Die restlichen Kultivierungsbedingungen blieben unverändert.

Aus den täglichen OCT-Aufnahmen ging schnell hervor, dass die Polymerzugabe, sowohl biotisch als auch abiotisch, eine starke Akkumulation großer Flocken auf der Kathode bewirkte. Die Beschichtung war so dick, dass der vom OCT-Gerät ausgesandte Lichtstrahl sie bereits ab Tag 2 nicht mehr vollständig durchdringen konnte, wodurch das Volumen unterquantifiziert wurde. Insbesondere in der abiotischen Negativkontrolle war die Intensität des Signals so gering, dass die unteren Schichten der Polymerstrukturen mittels OCT nur schwach abgebildet werden konnten. Aufgrund der daraus resultierenden starken Unterquantifizierung des Volumens wurde dessen quantitative Entwicklung im Folgenden nicht angegeben. Die Oberfläche der Biofilme, beziehungsweise der Polymerstrukturen, war von dem Problem der Unterquantifizierung jedoch nicht betroffen und konnte in den OCT-Aufnahmen originalgetreu dargestellt werden. Daraus folgend konnten die durchschnittliche Höhe des Biofilms sowie der Bedeckungsgrad der Kathode abgeleitet werden. Diese wurden in Abb. 22 dargestellt. Die Entwicklung der mittleren Höhe des Biofilms, welchem das mit Aldehyd B funktionalisierte Polymer zugegeben wurde, übertraf die beiden Kontrollansätze um mehr als das Doppelte. Das Maximum lag bei über 1 mm nach

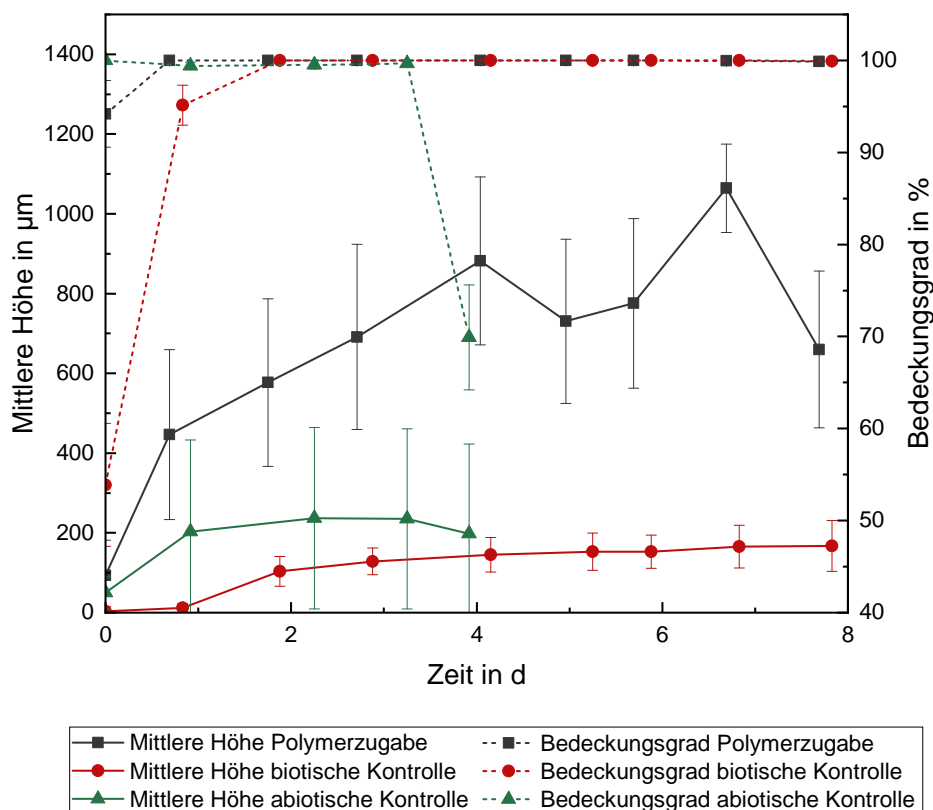


Abbildung 22: Polymerzugabe im bioelektrochemischen System. Gezeigt sind die mittlere Höhe (durchgehende Linien) und der Bedeckungsgrad (gestrichelte Linien) für die Zugabe des mit Aldehyd B funktionalisierten Polymers zu einer Zellkultur im bioelektrochemischen System (graue Kurven). Als Vergleich diente eine Kontrolle, welcher kein Polymer zugegeben worden war (rote Kurven), sowie eine Kontrolle, welcher keine Zellen zugegeben worden waren (grüne Kurven).

etwa sieben Tagen, während in der abiotischen Kontrolle nur 0,24 mm nach drei Tagen und in der biotischen Kontrolle 0,17 mm nach fast acht Tagen erreicht wurden. Die vollständige Elektrodenbedeckung wurde mit Zugabe des funktionalisierten Polymers schneller erreicht als in der biotischen Kontrolle ohne Polymerzugabe, für welche es in etwa zwei Tage brauchte. Der letzte Messwert für den Bedeckungsgrad in der abiotischen Kontrolle zeigte gerade mal knapp 70 % Bedeckung, hierbei handelte es sich jedoch um einen Auswertungsfehler der OCT-Aufnahmen aufgrund des schwachen Reflektionssignals der Probe. In den Höhenprofilen (Abb. 23) ist zu erkennen, dass sich die Bedeckung der Elektrode zwischen Tag drei und Tag fünf nicht relevant veränderte.

Die Höhenprofile liefern eine Information über die oberste Schicht der zu untersuchenden Strukturen. Deshalb konnten auch diese fehlerfrei mittels der OCT-Aufnahmen abgebildet werden. Hierbei fällt auf, dass die Höhe und Struktur des Biofilms mit der Polymerzugabe bereits nach

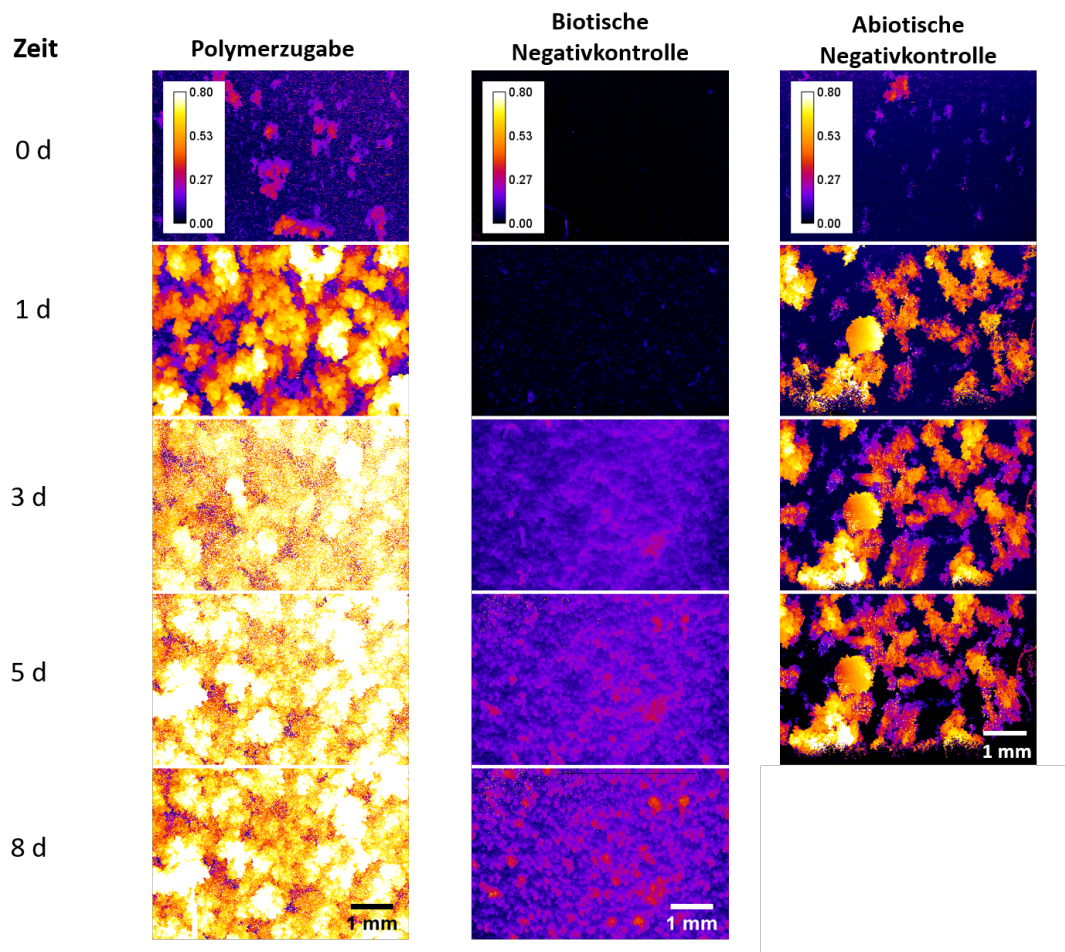


Abbildung 23: Höhenprofile des Biofilms mit und ohne Polymerzugabe sowie der abiotischen Negativkontrolle mit Polymerzugabe im bioelektrochemischen System. Gezeigt sind die Draufsichten der Biofilme direkt nach der Inokulierung sowie nach einem, drei, fünf und acht Tagen Kultivierung. Die Höhen in der Farblegende sind in mm angegeben.

drei Tagen in etwa konstant blieb, ebenso die Höhe der Polymerstrukturen in der abiotischen Negativkontrolle, während sich die Höhe des Biofilms bei der biotischen Negativkontrolle bis Tag acht weiterhin veränderte (Abb. 23).

Nachdem das Experiment beendet war, wurden Proben des Biofilms, welchem das funktionalisierte Polymer zugegeben worden war, mikroskopisch untersucht. Dabei wurde zunächst je eine Probe vom vorderen Ende, aus der Mitte und vom hinteren Ende der Elektrode mithilfe der Phasenkontrastmikroskopie betrachtet. Dabei konnte festgestellt werden, dass sich große Agglomerate des Polymers gebildet hatten, in welchen viele Zellen eingeschlossen waren (Abb. 24). Des Weiteren wurde eine Probe von der Mitte der Elektrode einer Lebend-Tot-Zellfärbung unterzogen. In der Theorie kann durch die Färbung zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden. Jedoch weist das Polymer sowohl im Spektrum des Lebendfarbstoffes Syto 9 als auch im Spektrum des Totfarbstoffes Propidiumiodid eine Autofluoreszenz auf, weshalb es auf den Auf-

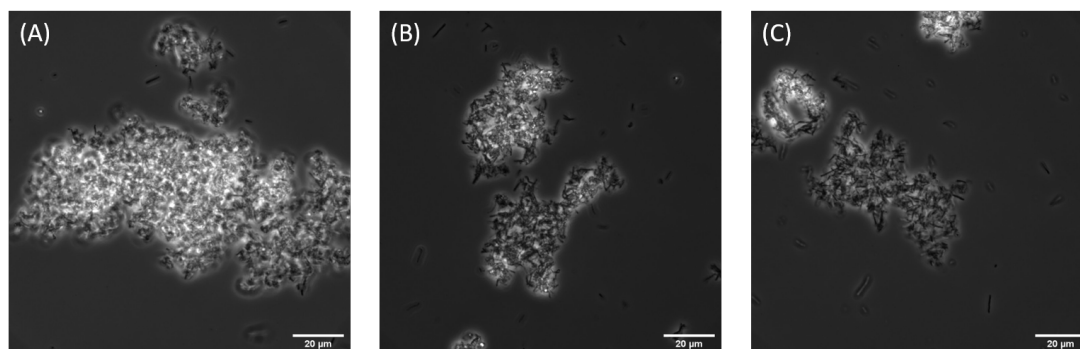


Abbildung 24: Phasenkontrastaufnahmen der Polymer-Zell-Agglomerate aus der oMES. Die Proben wurden jeweils an der vorderen (A), mittleren (B) oder hinteren (C) Messposition des OCTs auf der Kathode entnommen.

nahmen jeweils in grün oder rot hell leuchtend erscheint (Abb. 25). Daneben war es schwierig, die Signale für individuelle Zellen zu erkennen.

3.7 Anwendungsfall des Prozesses

Eine mögliche Anwendung des entwickelten Prozesses wäre die mikrobielle Verwertung industrieller Rauchgase. Diese entstehen häufig in Verbrennungsprozessen und treten daher mit hohen Temperaturen auf. Das in den Gasen enthaltene CO_2 soll den Mikroorganismen in einem solchen Prozess als Kohlenstoffquelle dienen. Als thermophiler Organismus ist *Kyrpidia spormannii* ein guter Kandidat für die Verwertung ebendieser Gase. Neben CO_2 enthalten industrielle Rauchgase jedoch auch andere Komponenten. Einen Großteil macht Stickstoff aus der Verbrennungsluft aus. Bei unvollständiger Verbrennung befindet sich zudem noch Sauerstoff im Gas. Des Weiteren können Wasser (H_2O), Schwefeldioxid (SO_2) oder Kohlenmonoxid (CO) im Gas vorkommen. Je nach Art des verbrannten Substrats können auch Stickoxide oder gar Schwermetalle auftreten (Thabit et al., 2022). Um die Kompatibilität von *K. spormannii* mit realen Rauchgasen aus der Industrie zu untersuchen, wurden Wachstumsstudien mit industriellen Rauchgasen aus Müllverbrennungsanlagen in Batch-Ansätzen durchgeführt. Die Experimente wurden in Kooperation mit der Energy from Waste GmbH (EEW) umgesetzt. Es wurden Rauchgasproben von drei verschiedenen Standorten entnommen (Stapelfeld, Delfzijl, Großräschen). Das Gas wurde auf eine O_2 -Konzentration von ca. 5 % verdünnt. So konnte das Wachstum auf industriellem Rauchgas von drei verschiedenen Standorten mit einander verglichen werden. Die Wachstumskurven sind in Abb. 26 gezeigt.

Nach einer zweitägigen Anlaufphase zeigten alle drei Ansätze exponentielles Wachstum. Im Mittel

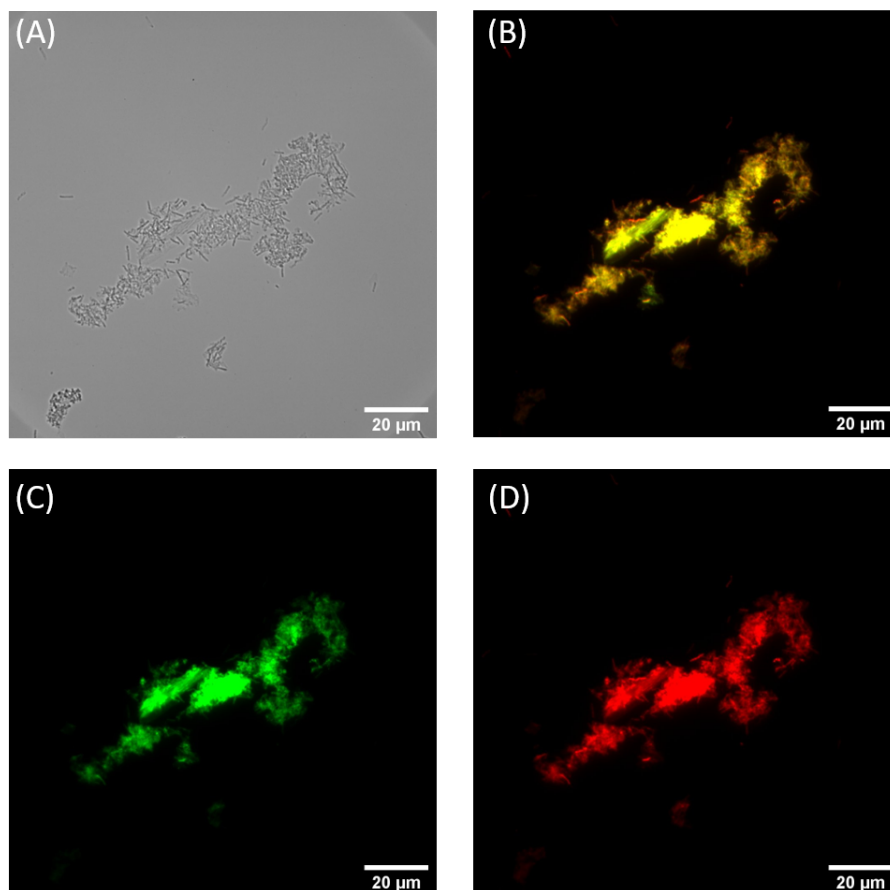


Abbildung 25: Lebend-Tot-Färbung der Polymer-Zell-Agglomerate aus der oMES. Die vier Aufnahmen zeigen dasselbe Agglomerat. Die Bilder wurden mit 100-facher Vergrößerung aufgenommen. (A) Aufnahme im Phasenkontrast; (B) Überlagerung der Fluoreszenzsignale für Lebend- und Totfärbung; (C) Fluoreszenzsignale für die Lebendfärbung; (D) Fluoreszenzsignale für die Totfärbung.

war das Wachstum mit dem Rauchgas aus Großräschen mit einer Wachstumsrate von $0,312 \text{ d}^{-1}$ das langsamste. Die finale OD_{600} in der stationären Phase wies jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den drei Standorten auf. Die stationäre Phase für das Wachstum auf Rauchgas aus Stapelfeld und Delfzijl war im Mittel nach zwölf Tagen erreicht, während es bei Rauchgas aus Großräschen 16 Tage dauerte, bis kein Wachstum mehr zu verzeichnen war.

Neben der Machbarkeitsstudie in Batch-Ansätzen wurde auch eine Studie zum elektroautotrophen Wachstum unter Verwendung des Rauchgases als Substrat durchgeführt. Das reale Rauchgas wurde unbedruckt entnommen. Eine nachträgliche Komprimierung war aufgrund von Korrosion des Druckbehälters wegen des enthaltenen Schwefelwasserstoffes nicht möglich. Da für das beschriebene bioelektrochemische System jedoch ein Überdruck von 1,5 bar nötig war, wurde statt des realen Rauchgases eine synthetische Gasmischung mit der gleichen Zusammensetzung verwendet. Nach elf Tagen und dann nach weiteren elf Tagen wurde der Biofilm partiell von der

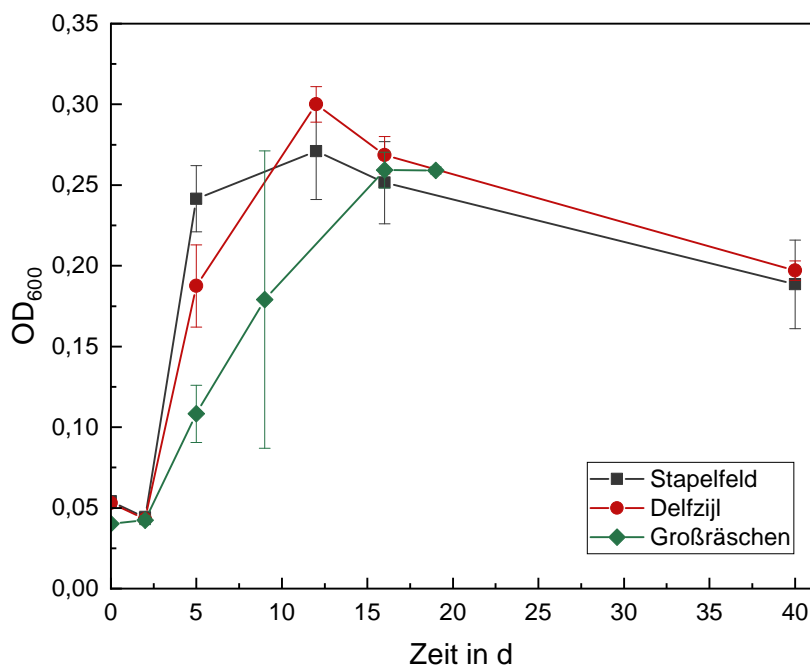


Abbildung 26: Wachstumsstudien mit industriellem Rauchgas als Substrat. Die optische Dichte von *K. spormannii* wurde in Duplikaten aufgezeichnet und für die Rauchgase aus den drei Standorten Stapelfeld (grau), Delfzijl (rot) und Großräschen (grün) miteinander verglichen. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung vom Mittelwert.

Elektrodenoberfläche abgelöst, um einen möglichen Wiederaufwuchs zu beobachten. Das relative Biovolumen und der Bedeckungsgrad der Elektrode wurden in Abb. 27 über die Zeit aufgetragen. Das relative Biovolumen stieg innerhalb von acht Tagen auf $172,1 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$ an, dann war die stationäre Phase erreicht. Die Elektrode war bereits nach vier Tagen vollständig von Biofilm bedeckt. Mit dem ersten Ablösevorgang wurden in etwa 86 % des Biovolumens entfernt. Nach elf Tagen betrug das relative Biovolumen $47,4 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$, was 29 % des ursprünglichen Werts entsprach. Die Bedeckung der Elektrode wurde auf knapp 45 % reduziert. Diese konnte sich innerhalb der nächsten elf Tage auf 59 % regenerieren. Nach einem weiteren Ablösevorgang, welcher das Biovolumen auf $26,6 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$ und den Bedeckungsgrad auf 51,5 % reduzierte, konnte in den folgenden zehn Tagen ein Anstieg des Biovolumens auf $59,0 \mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$ und des Bedeckungsgrades auf 73,6 % verzeichnet werden.

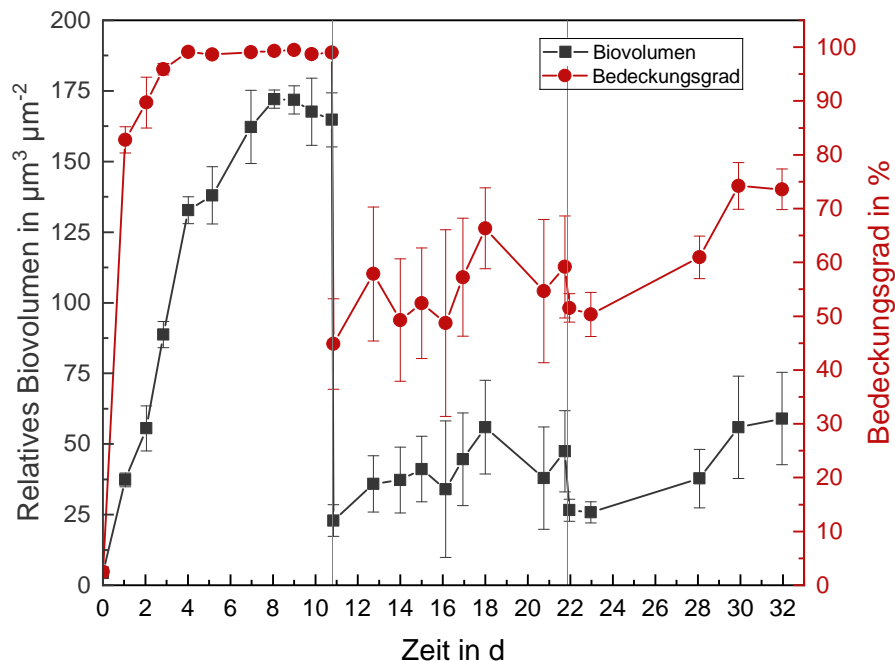


Abbildung 27: Elektroautotrophe Wachstumsstudie mit synthetischem Rauchgas als Substrat. Auf der linken y-Achse wurde das relative Biovolumen aufgetragen (grau). Auf der rechten y-Achse wurde der Bedeckungsgrad aufgetragen (rot). Nach elf Tagen wurde der Biofilm partiell von der Elektrode abgelöst und ohne Zugabe planktonischer Zellen weiter kultiviert. Dieses Vorgehen wurde nach weiteren elf Tagen wiederholt. Die Daten wurden aus OCT-Aufnahmen in Triplikaten berechnet. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung vom Mittelwert.

4 Diskussion

4.1 Untersuchungen zum Arbeitselektrodenpotential für einen möglichst effizienten Betrieb der oxischen mikrobiellen Elektrosynthese

In dieser Arbeit sollte ein Prozess zur oxischen mikrobiellen Elektrosynthese mit *Kyrpidia spormannii* unter besonderer Berücksichtigung der Prozesseffizienz untersucht werden. Das angelegte Arbeitselektrodenpotential hat einen entscheidenden Einfluss auf die Effizienz des Prozesses. Ein Ziel dieser Arbeit war es deshalb, den Bereich des Arbeitselektrodenpotentials zu finden, in welchem der Prozess mit der höchsten Effizienz betrieben werden konnte. Dazu musste zunächst der Potentialbereich bestimmt werden, in welchem der Betrieb der oMES in dem verwendeten System möglich war. Dieser definierte sich hauptsächlich über die Wasserstoffentstehung. Die obere Grenze war erreicht, wenn die Wasserstoffproduktion mit einer so großen Rate stattfand, dass makroskopische Blasen an der Kathodenoberfläche entstanden. Diese würden einen aufwachsenden Biofilm im laufenden Betrieb von der Elektrode abscheren und ein Biofilmwachstum somit verhindern. Mithilfe einer zyklischen Voltammetrie wurde diese obere Grenze, also das Entstehungspotential für Wasserstoffblasen, ermittelt. In Abb.5 zeigt die rote Kurve, welche die Stromstärke bei der Potentialabnahme beschreibt, eine deutliche Zunahme der Steigung ab einem Potential von etwa -550 mV vs. SHE . Diese Beobachtung hängt vermutlich mit der Blasenbildung von Wasserstoff zusammen. In der Literatur konnte dieser Effekt bei der Elektrolyse, insbesondere für erhöhte Drücke, ebenfalls beobachtet werden. Die Zunahme in der Stromstärke hängt laut Wu und Kolleg:innen damit zusammen, dass sich mit zunehmendem Potential unter erhöhten Drücken zum einen die Gaslöslichkeit von Wasserstoff erhöht und zum anderen die Blasenkonzentration an der Elektrodenoberfläche steigt. Für die Blasenbildung ist eine Übersättigung des Mediums mit dem gelösten Gas erforderlich. Um diese zu erreichen, braucht es aus den genannten Gründen eine höhere Triebkraft für die Wasserstoffentstehung. Diese Triebkraft ist der Stromfluss in das System (Wu et al., 2025). Möglicherweise spielen auch weitere Effekte eine Rolle, wie die Verkleinerung der Elektrodenoberfläche durch die Blasen (Bashkatov et al., 2024). Die Blasenbildung ab einem Potential von -550 mV vs. SHE konnte auch mit bloßem Auge beobachtet werden. Mit diesen Ergebnissen wurde die obere Grenze des Bereichs für mög-

liche Arbeitselektrodenpotentiale bei -550 mV vs. SHE festgelegt. Es sei vermerkt, dass dies das Entstehungspotential für Wasserstoffblasen in einem abiotisch betriebenen bioelektrochemischen System ist. Eine teilweise oder vollständige Bedeckung der Kathode mit Biofilm kann sich auf dieses auswirken. Der Biofilm reduziert die aktive Oberfläche der Elektrode, wodurch es niedrigerer Potentiale bedürfte, um die gleiche Wasserstoffentstehungsrate zu erreichen. Zudem kommt es durch den Biofilm zu Limitierungen im Massentransport, welche ebenfalls die Wasserstoffentstehung beeinflussen können.

Die untere Grenze liegt theoretisch bei 0 mV vs. Ag/AgCl oder $+199\text{ mV vs. SHE}$. Sobald -1 mV vs. Ag/AgCl an der Arbeitselektrode angelegt werden, fließt ein elektrischer Strom in das System. Unter den gegebenen Bedingungen kann eine mikrobielle Elektrosynthese jedoch nicht bei -1 mV vs. Ag/AgCl betrieben werden, wenn von einem Wasserstoff-abhängigen Transfer der Elektronen von der Kathode zu den Mikroorganismen ausgegangen wird (Ragab et al., 2020). Das theoretische Wasserstoffentstehungspotential kann durch die Nernst-Gleichung (Gleichung 1.1) berechnet werden. Für die gegebenen Kultivierungsbedingungen liegt es bei -231 mV vs. SHE oder $-430\text{ mV vs. Ag/AgCl}$. Wie bereits in Kapitel 1.2.2 hinreichend diskutiert, haben jedoch auch die Reaktionsbedingungen, das Überpotential und der biotische Wasserstoffverbrauch einen Einfluss auf das tatsächliche Entstehungspotential. Dieses theoretisch zu berechnen ist also nicht trivial. Deshalb wurden Wachstumsstudien mit *K. spormannii* bei verschiedenen Potentialen durchgeführt. Diese dienten unter anderem dazu, das geringst mögliche Kultivierungspotential zu bestimmen. In Abb. 7 ist zu sehen, dass bei einem Potential von 0 mV vs. SHE kaum Wachstum vorhanden war, bis das Potential auf -500 mV vs. SHE erhöht wurde. In einer Kontrollstudie wurde ebenfalls das Wachstum bei 0 mV vs. SHE beobachtet, jedoch wurde das Potential nicht erhöht (Abb. 28). In der Kontrolle ist kein Anstieg der Wachstumsrate des Biofilms zu beobachten. Daraus wurde geschlossen, dass ein Potential von 0 mV vs. SHE nicht ausreicht, um unter den gewählten Bedingungen einen Biofilm zu kultivieren.

Bei allen anderen untersuchten Potentialen war ein Biofilmwachstum zu beobachten. Obwohl das Wachstum bei -125 mV vs. SHE eine zeitliche Verzögerung von etwa neun Tagen im Vergleich zu dem Wachstum bei -375 mV und -500 mV vs. SHE aufwies, zeigten die Biofilme ein sehr ähnliches Wachstumsverhalten, sobald der Eintritt in die exponentielle Wachstumsphase erfolgte. So dauerte es für alle drei Biofilme in etwa sieben Tage vom Eintritt in die exponentielle Wachstumsphase bis zum Erreichen des maximalen Biovolumens. Die maximale Akkumulationsrate wurde in allen Fällen erreicht, als der Biofilm auf die Hälfte seines finalen Biovolumens aufge-

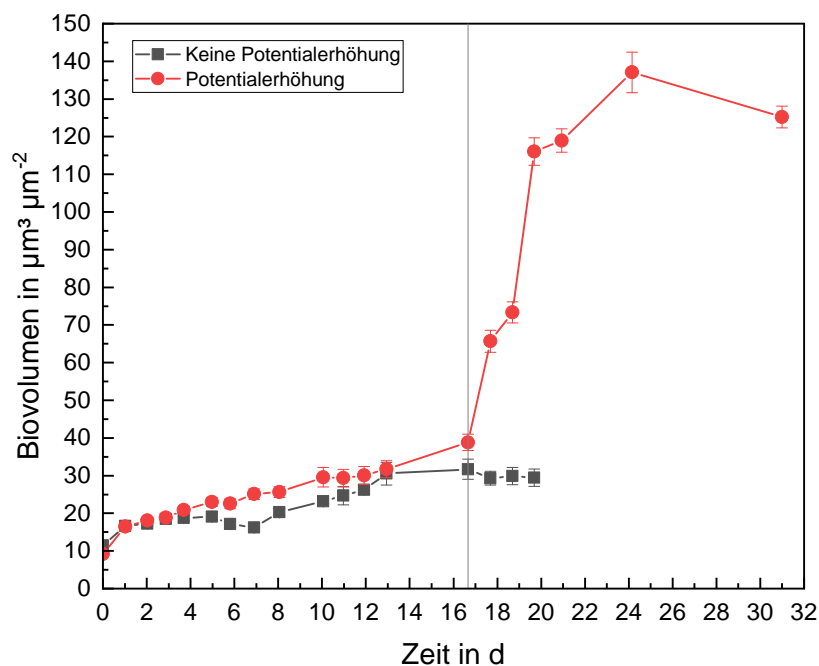


Abbildung 28: Wachstumsstudien bei 0 mV vs. SHE. Beide Kultivierungen wurden bei 0 mV vs. SHE gestartet. Bei der roten Kurve wurde das Potential nach knapp 17 Tagen auf -500 mV vs. SHE erhöht. Die graue Kurve diente als Kontrolle, hier wurde das Potential nicht erhöht.

wachsen war. Die vollständige Kathodenbedeckung war meist innerhalb von ein bis zwei Tagen nach Eintritt in die exponentielle Wachstumsphase erreicht. Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten ist in Abb. 29 dargestellt. Zu Beginn herrschen direkt an der Kathode eher wachstumshemmende Bedingungen. Es besteht eine elektrostatische Abstoßung zwischen den Zellen und der Elektrodenoberfläche, da beide negativ geladen sind (Das et al., 2021). Zudem können bei der oxischen mikrobiellen Elektrosynthese durch die Reduktion von Sauerstoff reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen, die das Biofilmwachstum ebenfalls hemmen können (Guo et al., 2019). Da Wasserstoff in einem elektroautotrophen System jedoch die einzige zur Verfügung stehende Energiequelle ist, sorgt die Entstehung von Wasserstoff dennoch dafür, dass sich die Zellen initial an der Kathodenoberfläche anlagern. Je höher das angelegte Potential ist, desto mehr Wasserstoff entsteht. Dies kann zu einem selbstverstärkenden Effekt führen. Je mehr Zellen sich an der Elektrodenoberfläche anlagern, desto mehr Wasserstoff steht zur Verfügung. Das liegt zum einen an der gesteigerten Wasserstoffentstehung durch den biotischen Wasserstoffverbrauch, welche von Philips und Kolleg:innen postuliert und in Kapitel 1.2.2 bereits ausführlich beschrieben wurde (Philips, 2020). Zum anderen wird der Wasserstoff mit höherem Bedeckungs-

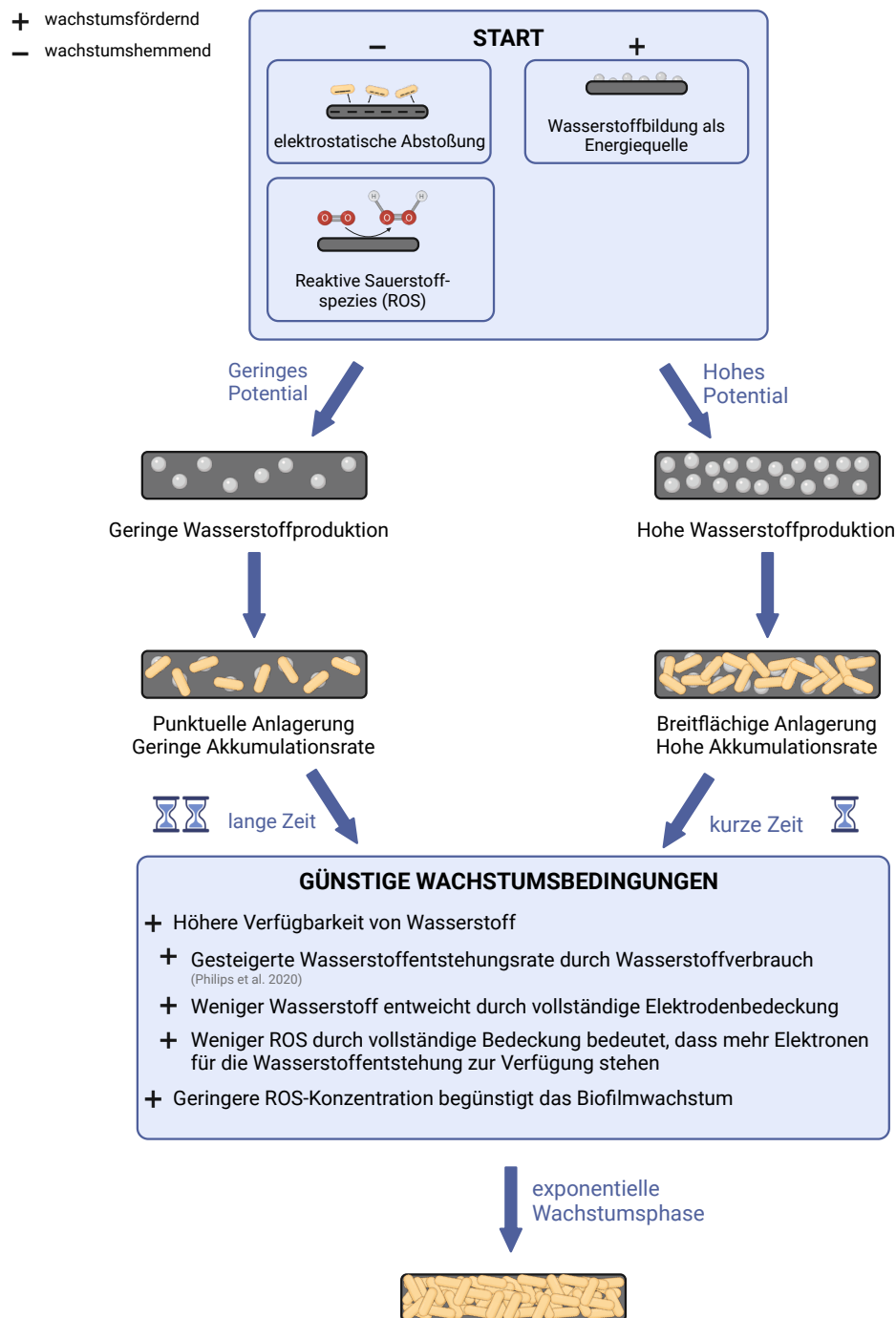


Abbildung 29: These zum Biofilmwachstum bei unterschiedlichen Potentialen. In der These wird davon ausgegangen, dass initiale wachstumshemmende Bedingungen bei hohen Potentialen durch die erhöhte Wasserstoffproduktion schnell ausgeglichen werden. Die hohe Anlagerung mikrobieller Zellen auf der Kathode fördert die schnellere Wasserstoffentstehung weiter, was zu einem selbstverstärkenden Effekt und somit dem Eintritt in die exponentielle Wachstumsphase führt. Die Abbildung wurde mit Biorender.com erstellt.

grad durch den Biofilm zurück gehalten und kann weniger leicht in das umgebende Medium entweichen. Zuletzt können mit steigender Elektrodenbedeckung weniger ROS entstehen, da der Sauerstoff nur noch kleinere Bereiche der Elektrodenoberfläche über das Medium direkt erreicht. Dies verringert zum einen die Ursachen für die wachstumshemmenden Bedingungen, zum anderen stehen dadurch mehr Elektronen für die Wasserstoffentstehung zur Verfügung, die zuvor für die Sauerstoffreduktion verwendet wurden. Diese Effekte verstärken sich selbst mit steigendem Bedeckungsgrad. Dies liefert auch eine mögliche Erklärung dafür, warum der Eintritt in die exponentielle Wachstumsphase jeweils kurz nach Erreichen der vollständigen Kathodenbedeckung erfolgte. Die selbstverstärkenden Effekte wirken so lange, bis es aufgrund der zu hohen Biofilmdicke zu Diffusionslimitierungen kommt. Abhängig von der Sauerstoffkonzentration im Medium und der Wasserstoffentstehungsrate wird entweder Sauerstoff oder Wasserstoff zur limitierenden Wachstumskomponente. Über eine in-silico Modellierung, wie sie in dieser Arbeit beschrieben wurde, kann ermittelt werden, welche Komponente das Wachstum limitiert.

Das angelegte Potential hat jedoch auch einen Einfluss auf die Elektronenverluste durch die Reduktion von Sauerstoff. In Abbildung 6 ist zu erkennen, dass die Stromdichte und damit die Menge an Elektronen, die in das System fließen, mit steigendem Potential ebenfalls steigen. Ein höheres Potential bedeutet eine höhere Triebkraft, Elektronen an die Umgebung abzugeben. Solange Sauerstoff als Elektronenakzeptor im Medium vorhanden ist, wird dieser reduziert. Das bedeutet, dass es gerade zu Beginn einer Biofilmkultivierung in einer mikrobiellen Elektrosynthese zu großen Elektronenverlusten durch Sauerstoff kommt. Um dies zu umgehen sollte versucht werden, so schnell wie möglich eine vollständige Elektrodenbedeckung zu erreichen. Eine mögliche Prozessführungsstrategie wäre deshalb, zu Beginn der Kultivierung ein niedriges Potential, wie -375 mV oder -500 mV vs. SHE, anzulegen. Sobald eine vollständige Bedeckung erreicht ist, kann das Potential beispielsweise auf -125 mV vs. SHE erhöht werden. Die in Kapitel 3.2 ermittelten Ergebnisse zu den Wachstumskinetiken geben Anlass zu der Annahme, dass der Biofilm mit vollständiger Elektrodenbedeckung auch nach einem Potentialwechsel hin zu einem niedrigeren Potential weiter mit einer ähnlichen exponentiellen Wachstumsrate wachsen würde wie zuvor mit einem höheren Potential. Mit der Reduzierung des Potentials könnten jedoch relevante Energieeinsparungen erreicht werden.

Im Folgenden soll kurz auf die Morphologie der Biofilme eingegangen werden. Wie und in welchen dreidimensionalen Strukturen Biofilme wachsen, ist eine komplexe Thematik. Die Mor-

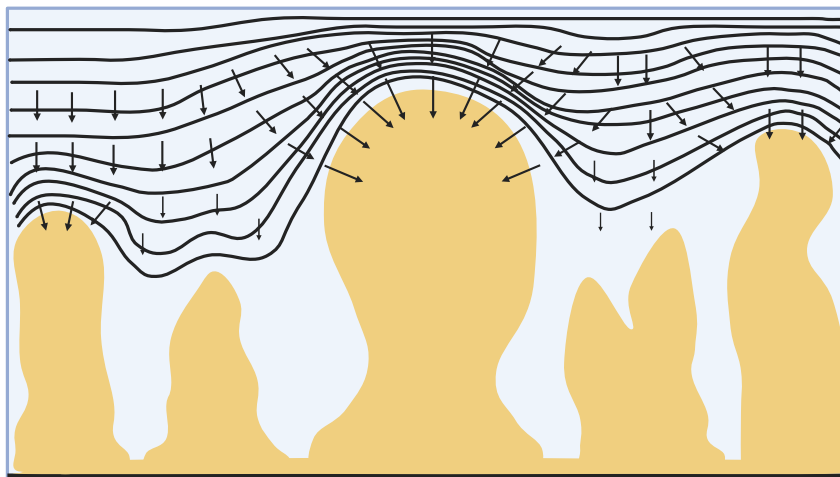


Abbildung 30: Entstehungstheorie zur Entwicklung der turmartigen Biofilmstrukturen. Gezeigt ist ein Querschnitt durch einen Biofilm, der von einem Substrat überströmt wird. Die Konzentrationslinien stehen für gleiche Substratkonzentration, die Pfeile zeigen Stärke und Richtung des lokalen Substratflusses. Der Prozess beginnt mit der punktuellen Anlagerung von Zellen auf der Elektrodenoberfläche. Aufgrund von Massenlimitierungen kommt es zur Unterversorgung der kleineren Biofilmstrukturen, die oberen werden weiterhin ausreichend mit Substrat versorgt. Die Türme wachsen deshalb an der Spitze immer weiter, wodurch die turmartigen Strukturen entstehen. Die Abbildung wurde abgewandelt nach Picioreanu et al. (1998) mit Biorender.com erstellt.

phologie von überströmten Biofilmen wird neben den biologischen Faktoren wie Wachstumsrate und Substrat-Umwandlungsrate hauptsächlich von zwei physikalischen Faktoren beeinflusst: Dem Massentransport der gelösten Substrate in den Biofilm und die Ausübung von Scherkräften auf den Biofilm (Stewart und Stewart, 2012; Picioreanu et al., 1998). Dies kann zu einem Phänomen führen, unter welchem der Biofilm in turmartigen (engl.: fingerlike) Strukturen aufwächst (Abb. 30). Dabei wird zunächst davon ausgegangen, dass sich initiale Biofilmkeime durch Anlagerung von Zellen auf einer Oberfläche, dem Substratum, bilden. Diese Anlagerung erfolgt im kathodischen bioelektrochemischen System aufgrund der Wasserstoffproduktion an der Kathode. Die Überströmung des Biofilms mit den im Medium gelösten Substraten führt zu einem Massentransport der Substrate in den Biofilm. Aufgrund des erhöhten Strömungswiderstandes über einem höheren Teil des Biofilms erhöht sich die Substratkonzentration dort lokal. Dadurch steht dem Biofilm an der Oberseite mehr Substrat zur Verfügung, was zu weiterem Wachstum führt. Gleichzeitig werden die unteren Bereiche des Biofilms aufgrund von Massentransportlimitierungen mit Substrat unterversorgt. Dies führt zu teilweise großen Höhenunterschieden zwischen benachbarten Biofilmstrukturen. Mit der Zeit entstehen so diese turmartigen Biofilmstrukturen, die auch in den Höhenprofilen (Abb. 8) zu beobachten waren. Die Diffusion der Nährstoffe in den Kanälen zwischen den Türmen erfolgt dagegen verhältnismäßig langsam und ist nicht aus-

reichend, um auch die unteren Schichten des Biofilms ausreichend zu versorgen. Die maximale Höhe des Biofilms ist erreicht, wenn die Ablöserate durch Scherkräfte genau so groß ist wie das Biofilmwachstum (Stewart und Stewart, 2012; Picioreanu et al., 1998; Vassilev et al., 2022).

4.2 Etablierung und Nutzen der in-silico Modellierung des Prozesses in COMSOL

Für diese Arbeit wurde die Substratdiffusion von Wasserstoff und Sauerstoff in einem *Kyrrpidia spormannii*-Biofilm modelliert. Es handelte sich um eine eindimensionale, stationäre Modellierung. Demnach konnten keine zeitlichen Änderungen, wie beispielsweise das Wachstum des Biofilms oder die Konzentrationsänderungen, bestimmt werden. Auch die Entwicklung zweidimensionaler oder gar dreidimensionaler Biofilmstrukturen konnten nicht simuliert werden. Mögliche Strömungseffekte und damit verbunden der Massentransport der Substrate bei Überströmung des Biofilms wurden ebenfalls nicht berücksichtigt. Mit der Modellierung konnten die Konzentrationsprofile von Wasserstoff und Sauerstoff über den Biofilm berechnet werden. Die Modellierung diente in dieser Arbeit dazu, zu bestimmen, welche Gelöstsauerstoffkonzentration bei bekannter Biofilmdicke und Wasserstoffentstehungsrate für ein unlimitiertes Biofilmwachstum ausreichend war. Die Parameter, welche spezifisch für *K. spormannii* und das beschriebene System sind, wurden eigens für die Modellierung bestimmt. Mit den gegebenen Parametern war hier die Entstehung von Wasserstoff limitierend für ein weiteres Biofilmwachstum bei einer Biofilmdicke von 300 μm . Allerdings wurde der Biofilm hier als gleichmäßiger Block auf der Elektrode betrachtet. Poren im Biofilm wurden über die Porosität berücksichtigt. Jedoch hat die tatsächliche dreidimensionale Struktur des Biofilms einen großen Einfluss auf die Diffusionseffekte, welche auch den Massentransfer in den Biofilm bestimmen (Picioreanu et al., 1998; Stewart und Stewart, 2012). Zudem wurde nicht berücksichtigt, welcher Anteil der zur Verfügung gestellten Elektronen tatsächlich für die Entstehung von Wasserstoff verwendet wurde, und wie groß der Anteil war, der in der Sauerstoffreduktion verloren ging. Die gezeigte Modellierung bot also nur einen groben Anhaltspunkt, um den Biofilm im realen Prozess mit ausreichend Sauerstoff zu versorgen. Für genaue Aussagen über den tatsächlichen Stofftransfer war sie nicht geeignet.

Es wurde bereits mit einer Weiterentwicklung der Modellierung begonnen (Rominger et al., 2024). Es handelte sich dabei immer noch um eine eindimensionale Modellierung, jedoch wurden die zeitlichen Änderungen der Biofilmdicke und der Substratkonzentrationen implementiert. Zudem

wurde über einen regelmäßigen, simulierten Gasphasenaustausch der Realbetrieb simuliert. Mithilfe der erweiterten Modellierung konnte gezeigt werden, dass Wasserstoff in der betrachteten Kultivierung nicht limitierend war. Ab dem vierten Tag der Kultivierung war eher der Sauerstoff wachstumslimitierend. Dadurch stieg die Wasserstoffkonzentration im Medium mit der Zeit weiter an, da das stöchiometrische Verhältnis im Verbrauch von Wasserstoff zu Sauerstoff, welches für ein unlimitiertes Wachstum nötig war, nicht mehr erhalten werden konnte. Mithilfe der Modellierung konnte also im Nachhinein der Zeitpunkt bestimmt werden, zu welchem die Gelöstsauerstoffkonzentration das Biofilmwachstum limitierte. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Kohlenstoffdioxid im betrachteten System nicht limitierend war. Auch in diesem Fall könnte der Prozess mit der zwei- oder dreidimensionalen Modellierung noch deutlich realitätsgetreuer abgebildet werden. Dennoch zeigte sich bereits mit der eindimensionalen Simulation, dass in-silico Modellierungen ein wichtiges Instrument in der oxischen mikrobiellen Elektrosynthese darstellen. Wie bereits mehrfach erwähnt, spielt die Sauerstoffkonzentration eine wichtige Rolle im Hinblick auf Effizienz und Produktivität von oMES-Prozessen. Wenn die optimale Sauerstoffkonzentration im Vorhinein über eine genaue Modellierung entwickelt werden könnte, könnten die Effizienz und Produktivität solcher oMES-Prozesse beträchtlich gesteigert werden.

4.3 Erste Effizienzbetrachtungen für die oxische mikrobielle Elektrosynthese

In dieser Arbeit wurden die ersten Effizienzbetrachtungen eines Prozesses zur oxischen mikrobiellen Elektrosynthese durchgeführt. Die Berechnung der Coulomb'schen Effizienz bei -500 mV vs. SHE zeigte, dass ein Prozessfenster existiert, in welchem der Prozess mit maximaler Elektroneneffizienz von 100 % betrieben werden kann. Das bedeutet, dass es in diesem Zeitfenster keine abiotischen Elektronenverluste gab. Tatsächlich zeigte der Verlauf zwischenzeitlich eine Coulomb'schen Effizienz von etwas über 100 %. Da dies ohne eine weitere Elektronenquelle im System nicht möglich ist, beruht diese Überschreitung mutmaßlich eher darauf, dass der Verlauf des Biovolumens und der Stromstärke mit Polynomfits angenähert wurden, die in diesem Bereich die Realität vermutlich nicht genau genug widerspiegeln. Mit steigender Coulomb'schen Effizienz werden die abiotischen Elektronenverluste geringer. Dies könnte bedeuten, dass weniger Sauerstoff als Elektronenakzeptor zur Verfügung stand, da die Mikroorganismen einen höheren Verbrauch haben. Wie auch bereits anhand der COMSOL-Modellierung postuliert, könnte es in

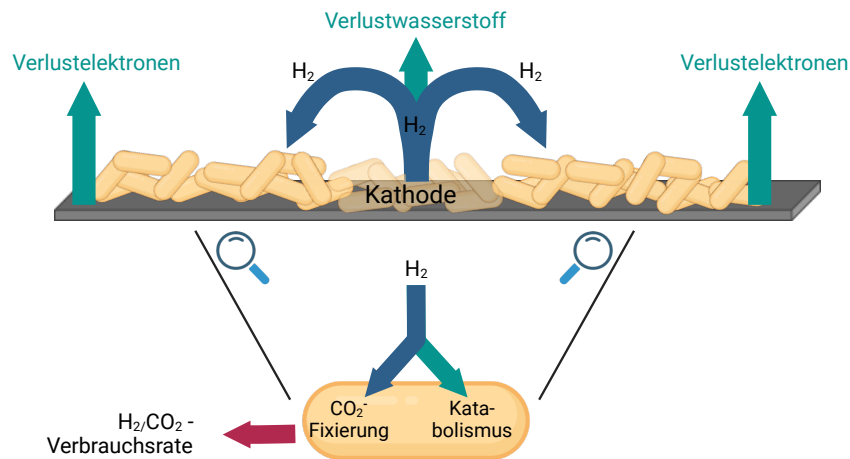


Abbildung 31: Elektronenverluste bei der mikrobiellen Elektrosynthese. Es wird davon ausgegangen, dass Wasserstoff als Elektronenüberträger dient. Elektronen in der MES können abiotisch verloren gehen, wenn sie für andere Reduktionsreaktionen verwendet werden. Auch Elektronen, die für die Produktion von Wasserstoff verwendet wurden, dieser jedoch nicht von den Mikroorganismen aufgenommen werden konnte, zählen als Verlust. Die Coulomb'sche Effizienz beschreibt den Anteil der zur Verfügung gestellten Elektronen, die für die Produktion von Wasserstoff verwendet werden, welcher tatsächlich zu dem Aufbau von Biomasse beiträgt. Die Abbildung wurde mit Biorender.com erstellt.

etwa ab Tag 4 zu einer Sauerstofflimitierung kommen.

In Abb. 31 wurde dargestellt, auf welche Weise Elektronen in der mikrobiellen Elektrosynthese verwendet werden können. Daraus ergibt sich auch die Bedeutung der Coulomb'schen Effizienz. Diese beschreibt, welcher Anteil der zur Verfügung gestellten Elektronen für den Aufbau von mikrobieller Biomasse verwendet wurde. Bei einer durchschnittlichen Coulomb'schen Effizienz von 78,81 % wurden im Durchschnitt etwas mehr als 21 % der zur Verfügung gestellten Elektronen nicht für Biomassewachstum verwendet, sondern gingen abiotisch verloren. Dies kann zum einen über Reduktion von beispielsweise Sauerstoff passieren, zum anderen kann es auch zu Elektronenverlusten in der Wasserstoffproduktion kommen, falls der produzierte Wasserstoff nicht von den Mikroorganismen aufgenommen werden konnte. Deshalb ist es sinnvoll, insbesondere die Prozesse zur oxischen mikrobiellen Elektrosynthese in einem maximal effizienten Prozessfenster zu betreiben. Im gezeigten Prozess wäre das der Zeitraum, ab welchem die Elektrode vollständig mit Biofilm bedeckt ist, bis zu dem Zeitpunkt, an welchem der Biofilm eine Dicke erreicht, welche zu Diffusionslimitierungen der gelösten Substrate führt. Ansonsten ist es schwierig, eine ähnliche Elektroneneffizienz wie in einer Gasfermentation zu erreichen (Rominger et al., 2024). Würde in einer solchen Gasfermentation der gesamte Wasserstoff von den Mikroorganismen als Elektronenquelle verwendet werden und würde von einem Wirkungsgrad von 100 % bei der Elektrolyse

ausgegangen werden, läge die CE bei 100 %. Jedoch bedeutet auch eine CE von 100 % nicht, dass alle Elektronen für die Reduktion von Kohlenstoffdioxid zu Biomasse verwendet wurden. Sie besagt nur, dass alle zur Verfügung gestellten Elektronen für den Aufbau von Biomasse verwendet wurden. Der Anteil, welcher tatsächlich für die Reduktion von CO₂ zu Biomasse verwendet wurde, kann über die H₂/CO₂-Verbrauchsrate ermittelt werden. Diese lag bei 7,5 mol H₂ pro mol fixiertem CO₂. Theoretisch wären jedoch nur 4,5 mol Elektronen, also 2,25 mol H₂ pro mol CO₂ nötig. Demnach werden nur 30 % der aufgenommenen Elektronen für die Reduktion von CO₂ verwendet. Der übrige Anteil wird für die mikrobielle Energiegewinnung, also den Katabolismus, benötigt.

Der gesamte Energiebedarf für die Biomasseproduktion mittels oxischer mikrobieller Elektrosynthese bei -500 mV vs. SHE lag bei 35,8 kWh kg⁻¹. Bemerkenswert ist, dass der Energiebedarf für das effizienteste Prozessfenster der oMES nur 11,88 kWh kg⁻¹ betrug. Dieser Wert könnte erreicht werden, wenn der Biofilm in dem optimalen Wachstumsfenster gehalten werden könnte, welches zwischen Tag 4 und 5 erreicht wurde. Zudem ist zu erwähnen, dass das verwendete bioelektrochemische System nicht dafür gebaut wurde, einen möglichst effizienten Betrieb zu gewährleisten. Das Material der Arbeitselektrode spielt eine große Rolle bei der Effizienz des Prozesses (Hui et al., 2023). Auch die Prozessführungsstrategie, wie beispielsweise das angelegte Potential, kann einen Einfluss auf den Energiebedarf des Prozesses haben (Das et al., 2020). Mit einigen Anpassungen könnte die Energieeffizienz des Systems also mutmaßlich noch gesteigert werden.

In einem zweistufigen Prozess, in welchem zunächst der Wasserstoff produziert und anschließend in einer Gasfermentation für die Biomasseproduktion verwendet werden würde, läge der Energiebedarf bei 33,5 kWh kg⁻¹ Biotrockenmasse. In der Literatur wurde ein ähnlicher Wert von 29,24 kWh kg⁻¹ für Wasserstoff-oxidierende Knallgasbakterien (Hydrogen oxidizing bacteria, HOBs) in einer Gasfermentation angegeben (Mishra et al., 2020). Im Gegensatz dazu steht der deutlich höhere Energiebedarf von 231,48 kWh, welcher für die Produktion von 1 kg Biotrockenmasse von Acetogenen benötigt werden würde (Mishra et al., 2020). Dieser hohe Energiebedarf könnte sich langfristig auch negativ auf die Produktion von Acetat oder Methan in der mikrobiellen Elektrosynthese auswirken. Die Prozesse wären insofern limitiert, als dass das Nachwachsen des Biokatalysators sehr energieintensiv wäre (PrévotEAU et al., 2020). Der Energiebedarf bei Verwendung acetogener Mikroorganismen für die Produktion von mikrobieller Biomasse kann gesenkt werden, indem diese Organismen zunächst in einer mikrobiellen Elektrosynthese Acetat

herstellen. Dieser Prozess kann mit einer hohen Coulomb'schen Effizienz betrieben werden (Labelle und May, 2017). Dieses kann in einem zweiten Schritt als Substrat für eine heterotrophe Biomasseproduktion mit *Saccharomyces cerevisiae* verwendet werden. Mit $11,39 \text{ kWh kg}^{-1}$ lag der Energiebedarf dieses Prozesses sehr nahe an dem Energiebedarf für die Biomasseproduktion von *K. spormannii* in dem effizientesten Prozessfenster der oMES (Mishra et al., 2020).

Im Vergleich mit verschiedenen Photosynthese-basierten Biomassensystemen zeigte sich, dass die oxische mikrobielle Elektrosynthese einen solaren Energiebedarf ähnlicher Größenordnung für die Produktion von 1 kg Biomasse aufwies. Ein höherer Wirkungsgrad für eine bakterielle Biomasseproduktion auf Knallgasbasis im Vergleich zur photosynthetischen Effizienz wurde von Lepidi und Kolleg:innen bereits im Jahr 1990 berichtet (Lepidi et al., 1990). Dies ist in erster Linie auf den höheren Umwandlungswirkungsgrad von Photovoltaikanlagen im Vergleich zur Photosynthese zurückzuführen (Blankenship et al., 2011; PrévotEAU et al., 2020). Damit ist die oxische mikrobielle Elektrosynthese als kompetitiv, insbesondere mit der Biomasseproduktion durch Mikroalgen, zu bewerten. Zudem bietet sie den Vorteil des geringeren Flächenbedarfs, da für die Kultivierung keine Lichteinstrahlung benötigt wird.

Reiner und Kolleg:innen haben kürzlich ein Review veröffentlicht, in welchem sie die oxische mikrobielle Elektrosynthese in Hinblick auf den Energiebedarf mit alternativen Technologien vergleichen. Ihre Berechnungen haben gezeigt, dass der Energiebedarf der oxischen mikrobiellen Elektrosynthese durchaus mit den bereits etablierten Technologien vergleichbar ist (Reiner et al., 2024). Solange ausschließlich der Energiebedarf für die Umwandlung von CO_2 zu Biomasse, exklusive der benötigten Energie für den Betrieb der Prozessperipherie, betrachtet wird, kann sich die oMES im Hinblick auf die Energieeffizienz zu einem vergleichbaren System zur Biomasseproduktion entwickeln.

4.4 Biomasse als Produkt: Ernte in der oxischen mikrobiellen Elektrosynthese

Produkte in der mikrobiellen Elektrosynthese waren bisher meist auf die Stoffwechselprodukte der anaeroben Wasserstoff-oxidierenden Mikroorganismen, wie Essigsäure oder Methan, beschränkt. Die Produktion von Biomasse dagegen beruhte zumeist auf alternativen Prozessen, wie heterotrophen oder Gasfermentationen. Seit einiger Zeit werden jedoch auch immer häufiger Knallgasbakterien in der mikrobiellen Elektrosynthese eingesetzt, um Biomasse zu produzieren

(Reiner et al., 2024). Deren Kultivierung weist einige Vorteile gegenüber alternativen Prozessen auf. Eine dieser Alternativen ist die Kultivierung von Mikroalgen in Photobioreaktoren. Da das Wachstum der Mikroalgen auf der Photosynthese beruht, haben diese Technologien einen großen Licht- und damit Flächenbedarf. Damit stehen sie insbesondere in der Flächennutzungskonkurrenz mit dem Lebensmittelanbau (Pander et al., 2020). Zudem weist die Kultivierung von Mikroalgen einen hohen Wasserbedarf auf. Die Ernte ist energieintensiv, denn die Mikroalgen, welche planktonisch kultiviert werden, müssen zunächst stark aufkonzentriert werden (Tan et al., 2020). Alternativ kann Biomasse aus CO₂ auch aus Gasfermentationen gewonnen werden. Hierbei werden Knallgasbakterien auf einer Gasmischung kultiviert, welche Wasserstoff, Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid enthält. Für diese Art der Kultivierung bestehen aufgrund der hohen Explosionsgefahr jedoch komplizierte Sicherheitsansprüche an das Reaktorequipment. Eine weitere Alternative wäre die Kultivierung der HOBs in einem Membran-Biofilmreaktor, welcher die Sauerstoff- und Wasserstoff-beinhaltenden Gasphasen voneinander trennt (Weiler et al., 2024). Jedoch wurden die Membran-Biofilmreaktoren entwickelt, um einen großen Anteil der Biomasse im System zurückzuhalten (Martin und Nerenberg, 2012). Eine Ernte der Biomasse von den einzelnen Membranfasern ist nicht vorgesehen.

Die oxische mikrobielle Elektrosynthese bietet ebenfalls den Vorteil des adhärenen Zellwachstums als Biofilm, jedoch lässt sich die Biomasse von einer glatten Elektrode leichter ernten als von den Membranbündeln in einem Membran-Biofilmreaktor. Für die Ernte der Biomasse aus einem kathodischen bioelektrochemischen System wurden bereits verschiedene Strategien vorgeschlagen (Rominger et al., 2024; Reiner et al., 2024). Beispielsweise könnte der Biofilm über eine bewegliche Klinge, die in einem gewissen Abstand über dem Substratum montiert ist, auf eine konstante Höhe gekürzt werden. In einem bioelektrochemischen Reaktor, in welchem die Elektroden als rotierende Scheiben angebracht sind, kann kurzzeitig die Rotationsgeschwindigkeit erhöht werden, um Teile des Biofilms von der Oberfläche abzuscheren (Hackbarth et al., 2023). In dieser Arbeit wurde eine Methode zur Ernte der Biomasse vorgeschlagen, die auf dem Anlegen kurzer, hoher Potentialpulse beruht. Dabei wurden über die Bildung von Wasserstoffblasen Teile des Biofilms abgelöst. Ziel war dabei, einen möglichst großen Anteil des Biovolumens abzulösen, dabei aber so wenig Elektrodenoberfläche wie möglich freizulegen. Mittels optischer Kohärenztomographie konnte die Abnahme des Biovolumens und des Bedeckungsgrades beim Anlegen verschiedener Potentiale überwacht werden. Mit einer Reduktion des Biovolumens um knapp 74% und einer anschließenden Elektrodenbedeckung von knapp 70% wurden mit dem Anlegen von -2,8 V vs. SHE für 2 min die besten Ernteparameter erzielt. Aus den Daten lässt

sich schließen, dass zu großen Teilen die oberen Schichten des Biofilms geerntet wurden, während mit 70 % ein relativ großer Anteil der Biofilmschicht direkt auf der Kathode erhalten blieb. Mithilfe einer Modellierung des Prozesses könnte der beste Zeitpunkt für die Biofilmernte bestimmt werden. Dieser wäre kurz vor Eintritt in die stationäre Wachstumsphase, solange sich der Biofilm noch im exponentiellen Wachstum befindet und bei maximaler Coulomb'schen Effizienz wächst, erreicht.

Für eine vollständige Ernte müssen die Biofilmpartikel nach dem Ablösen von der Flüssigphase getrennt werden. Die gängigsten Methoden zur Fest-Flüssig-Trennung von Zellkulturen sind Filtration oder Zentrifugation. Die Abtrennung der Biofilmflocken ist aufgrund ihrer Größe im Vergleich zu einzelnen Zellen leichter und damit weniger energieintensiv. Mögliche Produkte aus der Biomasse sollen im nächsten Kapitel diskutiert werden.

4.5 Mögliche Produkte aus der bioelektrochemischen Reduktion von CO₂ mit *Kyrpidia spormannii*

Um auf Dauer mit den uns zur Verfügung stehenden Ressourcen nachhaltig leben zu können, bedarf es großer Revolutionen in nahezu allen Wirtschaftsbereichen. Dazu gehört auch der Lebensmittelsektor. Der Term "Proteinwende" (engl. protein transition) beschreibt den Wandel weg von tierischen und hin zu alternativen Proteinquellen (Duluins und Baret, 2024). Das können pflanzliche, aber auch Proteinquellen anderer Art sein. Die Verwendung Wasserstoff-oxidierender Mikroorganismen für die Produktion von Einzelzellprotein gilt als vielversprechend (Pander et al., 2020). Knallgasbakterien gelten als gute Kandidaten für die Produktion von mikrobiellem Einzelzellprotein, da sie geringe metabolische Ansprüche haben und die Biomasse einen hohen Nährstoffgehalt aufweist (Pous et al., 2022).

Für *Kyrpidia spormannii* wurde mithilfe einer Proteinbestimmung nach Bradford bei heterotropher Kultivierung ein Proteingehalt von 56,82 % der Zelltrockenmasse gemessen. Bei elektroautotropher Kultivierung lag der Proteingehalt bei 61,92 %. Die Werte sind vergleichbar mit Literaturwerten für andere, ebenfalls Wasserstoff-oxidierende Organismen. Pous und Kolleg:innen haben den Proteingehalt einer Mischkultur aus einer oxischen mikrobiellen Elektrosynthese auf 59 % ± 8 % bestimmt (Pous et al., 2022). Der höchste Proteingehalt wurde mit 71 % ± 5 % von Matassa und Kolleg:innen in einer zweistufigen Gasfermentation erreicht (Matassa et al., 2016). Mithilfe einer sauren Hydrolyse und einer anschließenden Chromatografie wurden der Amino-

säuren-Gehalt und die Zusammensetzung bestimmt. Der Aminosäuregehalt lag bei 14,3 g pro 100 g Biofeuchtmasse. Verglichen mit dem per Bradford-Analyse bestimmten Proteingehalt ist das deutlich weniger. Das liegt zum einen daran, dass der Wert für die Aminosäuren auf die Feuchtmasse bezogen wurde, welche im Vergleich zur Biotrockenmasse in etwa zu zwei Dritteln aus Wasser besteht (Bratbak und Dundas, 1984). Zum anderen kann ein unvollständiger Proteinabbau bei der Aminosäureanalyse zu einer Unterschätzung des tatsächlichen Proteingehalts führen. Insgesamt wurde bei *K. spormannii* ein ähnlich hoher Aminosäuregehalt wie bei heterotroph kultivierten Hefen gefunden (Aruna et al., 2017). Obwohl nicht explizit analysiert, wird davon ausgegangen, dass die Biomasse von *Kyrpidia spormannii* genau wie die Biomasse anderer Mikroorganismen eine Quelle wertvoller Vitamine sein kann. Damit stellt diese eine gute Alternative zu tierischen Proteinquellen sowie zu anderen kritischen Eiweißlieferanten, wie beispielsweise Sojamehl, dar (Matassa et al., 2016; Sharif et al., 2021).

Als weiteres mikrobielles Produkt könnte das Speicherpolymer dienen, welches bekannterweise von *K. spormannii* produziert wird. In der Literatur wurde bislang vermutet, dass es sich dabei um Polyhydroxybuttersäure handelte (Reiner et al., 2020). Das Speicherpolymer konnte qualitativ nachgewiesen werden, jedoch war es in den ersten Untersuchungen des Extraktes mit der HPLC nicht als PHB zu identifizieren, weshalb eine Elementaranalyse sowie eine Kernspinresonanzspektroskopie durchgeführt wurden. Die Elementaranalyse zeigte eine grundlegend andere Zusammensetzung des Extraktes im Vergleich zu einem P3HB-Standard. Insbesondere der erhöhte Stickstoff- und Schwefelanteil deuteten auf eine Verunreinigung des Extraktes hin, da nach heutigem Stand kein bakterielles Speicherpolymer bekannt wäre, das diese beiden Komponenten in dieser Zusammensetzung enthalten würde (Mason-Jones et al., 2021, 2023). In der zweidimensionalen Kernspinresonanzspektroskopie konnte ein Zusammenhang der ^1H -Signale gefunden werden, welcher auf die Struktur von Poly-3-Hydroxybuttersäure hindeutet. Obwohl die Intensität im ^1H -Spektrum sehr gering ist, stimmen die Verschiebungen im Spektrum nahezu vollständig mit denen des P3HB-Spektrums aus der Literatur überein (Jan et al., 1996). Das erste Signal bei etwa 1,3 ppm wird der Methylgruppe zugeschrieben, die an ein Proton gekoppelt ist. Das zweite Signal bei etwa 2,0 ppm wird einer Methylengruppe zugeschrieben, die an ein asymmetrisches Kohlenstoffatom mit einem einzelnen Proton angrenzt. Das Mehrfachsignal bei 5,5 ppm ist charakteristisch für eine Methingruppe. Leichte Abweichungen in den chemischen Verschiebungen im Vergleich zur Literatur können aus unterschiedlichen chemischen Umgebungen resultieren. Beispielsweise haben der pH-Wert, die Temperatur oder das Lösemittel einen

Einfluss auf die chemischen Verschiebungen. Jedoch wurden auch in der Kernspinresonanzspektroskopie Hinweise auf eine mögliche Verunreinigung des Extraktes mit Proteinen, Lipiden und Wasser gefunden. Dies wäre der Fall, wenn diese Komponenten während der Fällung an das PHB gebunden gewesen wären und somit ebenfalls gefällt worden wären. Aufgrund der Verunreinigung war die Konzentration des P3HBs in dem Extrakt mutmaßlich zu gering und lag somit unter dem Detektionslimit der HPLC. Bei einer weiteren Untersuchung mittels HPLC, für welche eine größere Menge des Extraktes verwendet wurde, konnte P3HB in geringen Mengen detektiert werden. Die Probenvorbereitung für die HPLC schloss neben mehreren Schritten für die Extraktion auch eine starke Verdünnung um einen Faktor 1:3600 ein, um die konzentrierte Schwefelsäure, welche für die saure Hydrolyse des P3HB verwendet wurde, auf eine Konzentration von 5 mM für die HPLC zu verringern. Bei den sowieso schon geringen Konzentrationen an P3HB in den Extrakten aus heterotroph oder autotroph gewachsener Biomasse haben leichte Abweichungen solch starker Verdünnungen bereits einen großen Einfluss auf die gemessene Endkonzentration. Die gemessenen HPLC-Ergebnisse sollen deshalb weniger als quantitativer und mehr als qualitativer Nachweis der Produktion von Poly-3-Hydroxybuttersäure in *Kyripidia spormannii* dienen. Perspektivisch könnte versucht werden, den PHB-Gehalt pro Biotrockenmasse weiter zu erhöhen. In dieser Arbeit wurde qualitativ gezeigt, dass die Limitierung von Nährstoffen wie Stickstoff oder Phosphor die PHB-Produktion steigern kann. Literaturstudien bestätigten zudem, dass eine Variation der Kultivierungsbedingungen, wie beispielsweise der Kohlenstoffquelle, der Fütterungsstrategie, der Sauerstoffkonzentration oder auch des pH-Wertes unter anderem auch für *K. spormannii* einen Einfluss auf die PHB-Konzentration hatte (Peña et al., 2014; Pillot et al., 2022b). Für den Modellorganismus *Cupriavidus necator* DSM545 konnte dabei ein PHB-Gehalt von über 75 % erreicht werden. Auch eine genetische Manipulation der Stoffwechselwege zur PHB-Produktion stellt eine Alternative zur Erhöhung der PHB-Konzentration dar. Die PHB-Syntheserouten konkurrieren mit denen des zentralen Kohlenstoffmetabolismus. Wurden diese blockiert, konnte eine Steigerung der PHB-Produktion beobachtet werden (Peña et al., 2014). Zuletzt können der Zellaufschluss sowie die Extraktionsmethode einen Einfluss auf die Ausbeute und die Qualität des extrahierten Polymers haben (Balakrishna Pillai et al., 2018). Ein höherer PHB-Gehalt würde auch die Fehleranfälligkeit der Quantifizierung mittels HPLC verringern.

Polyhydroxybuttersäure ist ein Polyester aus der Gruppe der Polyhydroxyalkanoate. Diese sind grundsätzlich biokompatibel, wasserunlöslich und biologisch abbaubar (McAdam et al., 2020). Dies macht sie interessant für mögliche Anwendungen in der Medizintechnik oder der Verpackungsindustrie. PHB weist ähnliche Eigenschaften auf wie Polyethylen (PE) oder Polypropylen

(PP), ist jedoch thermisch instabil und spröde, was die Verarbeitung erschwert. Häufig werden stattdessen Co-Polymere wie Poly(3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyvalerat) (PHBV) verwendet, welche die nachteiligen mechanischen Eigenschaften von PHB ausgleichen (McAdam et al., 2020). Insgesamt bietet PHB ein großes Potential, die immer noch überwiegend verwendeten, Fossilbasierten Polymere zu ersetzen.

4.6 Verkürzen der Anlaufphase des Prozesses durch Zugabe eines Biofilm-induzierenden Polymers

Für *Escherichia coli* MC4100 konnte gezeigt werden, dass die Zugabe hydrophober Polymere eine Zusammenlagerung der Zellen bewirkte und damit die Bildung von Biofilm induzierte (Adoni et al., 2022). Diese Zusammenlagerung könnte unter anderem dadurch induziert worden sein, dass das Polymer nach seiner Protonierung in Essigsäure positiv geladen war, während die Zelloberfläche von Mikroorganismen meist negativ geladen ist (Wilson et al., 2001). Es besteht also eine elektrostatische Anziehung.

Dieser Stamm, welcher sonst kaum Biofilm bildete, konnte durch Zugabe des Polymers eine ähnlich gute Biofilmbildung erreichen wie der Stamm PHL644, welcher durch eine Punktmutation auf die Biofilmbildung trainiert wurde. Die Zugabe des Polymers konnte also einen ähnlichen Effekt bewirken wie eine gezielte Anpassung des Genoms (Adoni et al., 2022). Da eine gentechnische Veränderung von *Kyrpidia spormannii* aufgrund des Fehlens eines genetischen Systems bislang nicht möglich ist, stellt diese Methode eine Alternative dar, die Biofilmbildung, insbesondere zu Beginn der Kultivierung, zu beschleunigen. So könnte die Startphase, welche aufgrund großer Anteile unbedeckter Elektrodenoberfläche energetisch ineffizient ist, verkürzt werden.

In einer ersten Studie wurde zunächst untersucht, welche Funktionalisierung des Polymers für eine Verbesserung des Biofilmwachstums funktionieren kann. Hierfür wurde das Polymer mit verschiedenen Aldehyden aus den Gruppen der aromatischen, heterozyklischen und aliphatischen Aldehyde funktionalisiert. Aus den Kontrollansätzen im Vergleich zur reinen Zellkultur (CZ) konnte bereits geschlossen werden, dass weder die Lösemittel noch das Polymer oder die Aldehyde alleine das Wachstum inhibieren. Aus der Beurteilung der Biofilmbildung mittels Kristallviolett-Färbung wurden vier Kandidaten der Aldehyde für weitere Untersuchungen gewählt. Mit den Aldehyden B, C, I und K wurden damit ein aromatisches, zwei heterozyklische und ein aliphatisches Aldehyd untersucht, welche alle ähnliche Ergebnisse zeigten. In der Studie zu *E. coli*

dagegen haben die aromatischen Aldehyde die aliphatischen Aldehyde in Bezug auf die Verbesserung der Biofilmbildung übertroffen (Adoni et al., 2022).

Darauf folgten Beobachtungen des planktonischen Zellwachstums für diese Auswahl an Aldehyden. Die absolute OD₆₀₀ nach 95 h lag zwischen 0,2 und 0,35 für alle Ansätze sowie die Kontrollen. Da jedoch das Polymer selbst auch Licht bei 600 nm absorbieren kann, sollte eher die Änderung der optischen Dichte betrachtet werden. Die planktonische Wachstumsrate in den Ansätzen, welchen ein funktionalisiertes Polymer zugegeben wurde, war generell kleiner als bei den Kontrollen. Dies kann darauf hindeuten, dass das Wachstum hier eher in Form von Biofilmen an den Behälterwänden stattgefunden haben könnte.

Über eine Lebend-Tot-Färbung wurde anschließend überprüft, ob Polymer, Aldehyd oder die Lösemittel einen schädlichen Einfluss auf die Zellen haben können. Zunächst war in den Aufnahmen deutlich zu sehen, dass die Zellen von dem Polymer eingeschlossen waren. Dies bekräftigt die oben genannte Theorie, wie es zu verbesserter Biofilmbildung kommen kann. Des Weiteren konnte für Aldehyd K (Hexanal) beobachtet werden, dass ein großer Anteil der Zellen, welche von dem Polymer eingeschlossen wurden, tot war. Hexanal ist ein bekannter antimikrobieller Wirkstoff, welcher die Zellmembranen beschädigt und damit den Zelltod herbeiführt (Fan et al., 2025). Möglicherweise kamen diese antimikrobiellen Eigenschaften auch in der Bindung mit dem Polymer zur Geltung. Für alle anderen Aldehyde wurde kein relevanter Anteil toter Zellen im Vergleich zu lebenden Zellen festgestellt. Interessanterweise scheint jedoch die Zugabe des Polymers alleine ebenfalls einen schädlichen Effekt auf die Zellen gehabt zu haben. Für eine Untersuchung der Genantwort auf mögliche schädliche Effekte wurde eine Transkriptomanalyse durchgeführt. Hierbei wurde untersucht, wie sich das Polymer, funktionalisiert mit Aldehyd B, C oder K, auf die Transkription der Gene auswirkte.

In Tabelle A1 wurden alle Gene aufgelistet, die in Bezug auf die Referenz, welcher kein Polymer zugegeben wurde, um mindestens einen Faktor drei hoch- oder herunterreguliert wurden. Mithilfe einer Datenbank wurde den Gensequenzen das Protein zugewiesen, für welches sie codieren. Einigen der Gene konnte bislang kein Protein bekannter Funktion zugewiesen werden. Dies war immer dann der Fall, wenn die NCBI ID auf ein hypothetisches Protein verwies.

Zunächst fällt auf, dass die drei Aldehyde scheinbar eine unterschiedliche Wirkung auf die Gentranskription hatten, da sich der Faktor, um welchen das Gen hoch- oder herunterreguliert wurde, meist für jedes Aldehyd unterschied. Im Folgenden wurde untersucht, welche der relevant regulierten Gene für eine gesteigerte Biofilmbildung verantwortlich sein könnten. Unter

den hochregulierten Genen befanden sich unter anderem zwei Sporulationsgene (CVV65-02270 und CVV65-11025). In der Literatur wird beschrieben, dass Sporulation mit Biofilmbildung verknüpft sein kann (Hamon und Lazazzera, 2001). Möglicherweise haben die Stressbedingungen zu einer Biofilmbildung geführt. Sporenbildung kann ebenfalls unter Stressbedingungen auftreten. Des Weiteren wurde ein Toxin-Antitoxin-System (CVV65-05675) bei allen drei Aldehyden überexprimiert. Diese Systeme sind bei persistenten Zellen in Biofilmen aktiv. Auch hier wurden in der Literatur bereits Fälle untersucht, in welchen demonstriert wurde, dass aktive Toxin-Antitoxin-Systeme einen positiven Einfluss auf Biofilmbildung haben können (Kim et al., 2009; Mai-Prochnow et al., 2006). Möglicherweise führten die freigesetzten Toxine und die darauf folgende Zellyse zu einer stärkeren Zellaggregation aufgrund der freigesetzten DNA. Auch die Überexpression des σ E-Faktors (CVV65-02285) ist oft mit Zellstress und Oberflächenadhäsion assoziiert. Für *E. coli* wurde nach Deletion des σ E-Stoffwechselweges eine verringerte Zelladhäsion beobachtet (Chassaing und Darfeuille-Michaud, 2013).

Es wurden einige Gene für Transporter hoch- oder herunterreguliert. Die Transportersysteme sind komplex, und eine direkte Verbindung zu einer möglichen Induktion der Biofilmbildung ist teilweise schwer zu erkennen. Dennoch konnten in der Literatur einige Zusammenhänge gefunden werden. In *K. spormannii* wurde unter Polymerzugabe ein Multidrug-Transporter hochreguliert (CVV65-03490). Für *Escherichia coli* wurde festgestellt, dass bestimmte Multidrug-Effluxpumpen wesentlich zur Biofilmbildung beitragen. Mutanten, denen diese Pumpen fehlten, zeigten eine stark reduzierte Biofilmbildung (Matsumura et al., 2011). Mit CVV65-14010 wurde ein Glutathion-ABC-Transportergen hochreguliert. Für *Pseudomonas aeruginosa* wurde gezeigt, dass auch Glutathion eine Rolle bei der Regulation der Biofilmbildung spielen kann (Zhang et al., 2019). Jedoch sind die genauen Mechanismen komplex und erfordern weitere Untersuchungen. Es erfolgte ebenfalls eine Herunterregulierung einiger Transportersysteme, beispielsweise für den Cobalt-Transport (CVV65-04110), den Molybdat-Transport (CVV65-08070) oder für den Transport von Aminosäuren (CVV65-08540, CVV65-08245, CVV65-14955, CVV65-08250, CVV65-12960 und CVV65-14950). Die Herunterregulierung dieser Transportersysteme zeigt verringerte metabolische Aktivität. Diese könnte ein Resultat eines Stresszustandes sein, in welchem sich die Zellen befinden. Es ist bekannt, dass verschiedene Stressfaktoren Biofilmbildung induzieren können (Halan et al., 2012). Obwohl spezifische Studien fehlen, könnte ein geringerer Nährstofftransport also darauf hindeuten, dass weniger planktonisches Wachstum stattfand und die Zellen stattdessen eher in Biofilmform gewachsen sind. Eine Unterexpression der Pyruvat-Dehydrogenase (CVV65-08525, CVV65-10295) könnte eine Umstellung auf alternative Stoffwech-

selwege fördern, die mit Biofilmbildung assoziiert sind. Zuletzt soll darauf hingewiesen werden, dass auch der Kohlenstoff-Metabolismus (CVV65-14455, CVV65-13180, CVV65-13175, CVV65-13185, CVV65-13170, CVV65-13925, CVV65-13920, CVV65-13930) herunterreguliert wurde, was auf eine geringere katabolische Aktivität hindeutet. Dies ist ein möglicher Hinweis darauf, dass sich die Zellen in einen Biofilmzustand zurückziehen, anstatt aktiv zu wachsen (Akouris et al., 2024; Kaval und Garsin, 2018).

Die Zugabe des Polymers in das bioelektrochemische System hatte einen großen Einfluss auf die Dicke des Biofilms. Aus den Berechnungen der mittleren Höhe ging hervor, dass der Anstieg bei Polymerzugabe zur Zellkultur im Vergleich zur biotischen Negativkontrolle deutlich schneller erfolgte und auch die maximale Höhe größer war. Auch die Zugabe des Polymers alleine, ohne Zellen, bewirkte keinen so starken Anstieg. Die mittlere Höhe des Biofilms bei Polymerzugabe pendelte sich ab Tag vier bei etwa 800 μm ein, schien aber stark zu schwanken. Die Höhenprofile zeigen jedoch, dass sich die Oberflächenstruktur von Tag fünf bis Tag acht kaum veränderte. Deshalb wird davon ausgegangen, dass die scheinbare Schwankung in der mittleren Dicke eher aus unzureichender Auswertbarkeit der OCT-Aufnahmen resultierte. Anhand der Höhenprofile war zudem zu erkennen, dass sich die Struktur des Biofilms mit der Zugabe des Polymers nicht grundlegend zu natürlich gewachsenen Biofilmen unterschied.

Die Auswertung der OCT-Aufnahmen der abiotischen Negativkontrolle war herausfordernd, da die Intensität des Signals sehr schwach war und sich somit häufig nur schwer von den Hintergrundsignalen unterscheiden ließ. Bei der biotischen Polymerzugabe lieferten die Zellen im Biofilm noch einen besseren Kontrast in den OCT-Aufnahmen. Dennoch ist in den Höhenprofilen zu erkennen, dass die Beschichtung der Elektrode weniger dick und weniger gleichmäßig war als der Biofilm mit Polymerzugabe. Im direkten Vergleich blieben größere Flächen der Elektrode scheinbar nahezu unbedeckt. Die Zunahme der Dicke des Biofilms bei Polymerzugabe im Vergleich zur biotischen Negativkontrolle ist also nicht alleine auf die Anlagerung des Polymers auf der Kathode zurückzuführen. Vielmehr scheinen die Zellen einen relevanten Einfluss auf die Agglomeration und die Anlagerung des Polymers an die Kathode zu haben.

In der Phasenkontrastmikroskopie konnte die grundlegende Struktur der Polymer-Zell-Agglomerate untersucht werden. Es waren einzelne Agglomerate zu erkennen, welche jeweils eine große Menge an Zellen einschlossen. Dabei konnte kein Unterschied in der Struktur dieser Agglomerate zwischen den verschiedenen Positionen der Probenahme festgestellt werden. Der Einschluss der Zellen beruhte vermutlich auf elektrostatischer Anziehung (Adoni et al., 2022). Unter Berücksichtigung

sichtigung der Tatsache, dass sich die Dicke des Biofilms ab Tag drei nicht relevant veränderte, zusammen mit den Mikroskopaufnahmen im Phasenkontrast, stellt sich die Frage, ob es nach der initialen Agglomeration zu weiterem Zellwachstum kam, oder ob lediglich die mit dem Inokulum zugegebenen planktonischen Zellen von dem Polymer eingeschlossen wurden.

Die abschließende Untersuchung, ob das Polymer einen schädlichen Einfluss auf das Biofilmwachstum hatte, wurde mithilfe einer Lebend-Tot-Färbung durchgeführt. Während der Aufnahme ergab sich der Eindruck einer höheren Anzahl grün fluoreszierender, also lebender, im Vergleich zu rot fluoreszierenden, toten, Zellen. Jedoch ist dies aufgrund der Autofluoreszenz des Polymers alleine mit der Betrachtung der Mikroskopaufnahmen schwierig zu beurteilen. Die Autofluoreszenz des Polymers war hier noch größer als bei den zuvor durchgeführten Lebend-Tot-Färbungen der planktonischen Zellkulturen (Abb. 20). Dies könnte damit zusammenhängen, dass bei den beiden Versuchen zwar das gleiche Polymer verwendet wurde, jedoch unterschiedliche Chargen. Das Polymer, welches dem bioelektrochemischen System zugegeben wurde, wurde als zweites hergestellt. Bereits kleine Unterschiede im Syntheseprozess, im Transport oder in der Lagerung des Polymers können einen Einfluss auf die Autofluoreszenz haben. Um diesen genauer zu bestimmen, müsste zunächst untersucht werden, welche Faktoren für die Autofluoreszenz des Polymers verantwortlich sind. Für eine abschließende Beurteilung des Einflusses des Polymers auf die Zellen müsste also eine alternative Methode zur Überprüfung der Zellviabilität gewählt werden, beispielsweise mithilfe eines Resazurin-Assays (Rampersad, 2012).

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Zugabe eines funktionalisierten Polymers die Biofilmbildung, auch im bioelektrochemischen System, beschleunigen kann. Wie bereits zuvor diskutiert, ist die initiale Phase des Prozesses die am wenigsten effiziente. Durch die schnellere vollständige Bedeckung der Kathode nach der Polymerzugabe könnte die Prozesseffizienz verbessert werden. Jedoch müsste zuvor geklärt werden, ob es nach der Polymerzugabe noch zu weiterem Zellwachstum kommt, oder ob nur die zuvor planktonischen Zellen von den Polymer-Agglomeraten eingeschlossen werden. Für eine tatsächliche Anwendung, insbesondere im Lebensmittelsektor, müsste weitergehend untersucht werden, wie gut sich die Biomasse von dem Polymer trennen lässt. Dennoch stellt diese Methode eine interessante Alternative dar, die Effizienz des Prozesses in der Anlaufphase zu verbessern.

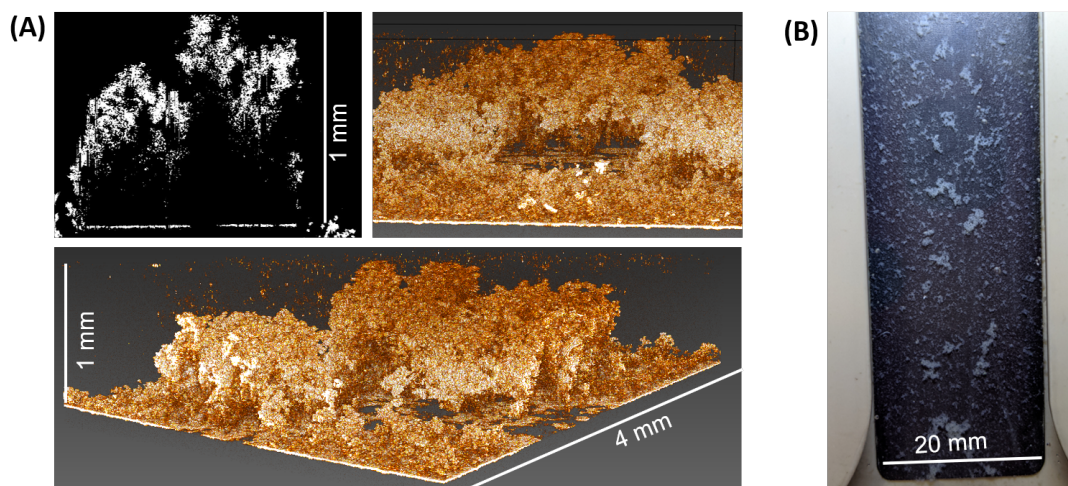


Abbildung 32: Unterquantifizierung des zu hohen Biofilms in den OCT-Aufnahmen. Nach der partiellen Ernte scheint der anschließende Wiederaufwuchs des Biofilms alleine aus den OCT-Aufnahmen keine Zunahme des Biovolumens zu zeigen. Allerdings ist auf der Kathode erneut eine große Menge an Biomasse aufgewachsen. Der Biofilm war jedoch so hoch, dass der von dem OCT-Gerät ausgesandte Lichtstrahl ihn nicht mehr komplett penetrieren konnte. Es folgte eine Unterquantifizierung des Biofilms. **(A)** Diese ist in den Aufnahmen an den vermeintlichen Hohlräumen in den unteren Biofilmschichten gut zu erkennen. **(B)** Photographie des Biofilms an Tag 4 des Wiederaufwuchses.

4.7 Untersuchung eines möglichen Anwendungsfalls

Ein Anwendungsfall der oxischen mikrobiellen Elektrosynthese mit *Kyrpidia spormannii* wäre die mikrobielle Verwertung industrieller Rauchgase. Anhand der durchgeführten Experimente mit verdünntem Rauchgas konnte gezeigt werden, dass sich keine für *K. spormannii* wachstumshemmenden Komponenten im realen Rauchgas befanden. Mit Betrieb des bioelektrochemischen Systems konnte anschließend auch der tatsächliche Anwendungsfall demonstriert werden. Bei reiner Betrachtung des Verlaufs des Biovolumens scheint es, als würde der Biofilm nach der partiellen Ernte nicht mehr sein ursprüngliches Volumen erreichen. Jedoch trat das Biofilmwachstum in großen Flocken auf, welche so hoch waren, dass sie über die optische Kohärenztomographie nicht vollständig quantifiziert werden konnten. Der Lichtstrahl konnte den Biofilm nicht bis in die unteren Schichten penetrieren, weshalb diese in den Aufnahmen als Hohlraum erschienen (Abb. 32) und nicht als Biofilm quantifiziert wurden. Das tatsächliche Biovolumen war demnach deutlich höher als die OCT-Aufnahmen vermuten ließen. Ein Wiederaufwuchs war also auch mit einer Gasphase, welche in der Zusammensetzung einem industriellen Rauchgas glich, möglich. In der Literatur wurden bislang zwar wenige, aber erfolgreiche weitere Studien zum Betrieb einer mikrobiellen Elektrosynthese unter Verwendung realer Rauchgase als Kohlenstoffquelle durchgeführt. Roy und Kolleg:innen haben 2021 mit einer Mischkultur, welche von *Acetobac-*

terium-Kulturen dominiert war, eine Acetatproduktion auf Brauerei-Abgasen erreicht, welche der von *C. ljungdahlii* in Reinkultur überlegen war. Der Prozess erreichte eine Elektroneneffizienz von $84\% \pm 13\%$. Kürzlich wurde auch ein oMES-Prozess zur Produktion von PHB mit realem Rauchgas betrieben. Hierbei wurde *Cupriavidus necator* in einer H-Zelle direkt auf dem Betriebsgelände eines Blockheizkraftwerks kultiviert. Auch hier hatte das Abgas keinen negativen Effekt auf das Wachstum oder die PHB-Produktion (Langsdorf et al., 2024). Die Ergebnisse stimmen zuversichtlich, dass eine zukünftige industrielle Anwendung der mikrobiellen Elektrosynthese unter Verwendung von Rauchgasen als Kohlenstoffquelle möglich sein wird.

5 Fazit und Ausblick

Die mikrobielle Elektrosynthese hat das Potential, einen bedeutenden Beitrag zur Dekarbonisierung der Industrie zu leisten (Dessi et al., 2021). Über den Wood-Ljungdahl-Weg kann Kohlenstoff mit sehr hohen Elektroneneffizienzen mikrobiell fixiert werden. Jedoch müssen die Organismen dafür unter strikt anoxischen Bedingungen kultiviert werden, was entweder den Einbau einer Protonenaustauschmembran oder den komplett anoxischen Betrieb des Prozesses erfordert. Beide Maßnahmen erhöhen die Komplexität und damit die Kosten eines Prozesses (PrévotEAU et al., 2020). Das Spektrum der möglichen Endprodukte ist zudem begrenzt, da durch die Nutzung von CO₂ als Elektronenakzeptor weniger Energie zur Verfügung steht. Im Gegensatz dazu bietet die oxische mikrobielle Elektrosynthese den Vorteil, dass durch die Nutzung von Sauerstoff als Elektronenakzeptor Endprodukte mit einem höheren Energiegehalt hergestellt werden können. Auch ist das Spektrum an möglichen Endprodukten im Vergleich zur anoxischen MES größer. Die direkte Umwandlung von CO₂ und elektrischer Energie in chemische Energieträger kann zudem als Möglichkeit betrachtet werden, regenerative Energien in chemischer Form zu speichern (Dessi et al., 2021). Allerdings bestehen auch hier noch einige technologische Herausforderungen. Bisher konnte die oxische mikrobielle Elektrosynthese nur mit geringer Energieeffizienz betrieben werden. Es wurden erst wenige Knallgasbakterien auf einen möglichen Einsatz in einem bioelektrochemischen System hin untersucht, darunter der Modellorganismus *Cupriavidus necator*. Die Technologiereife (Technology Readiness Level, TRL) der oxischen mikrobiellen Elektrosynthese liegt bei einem Level 3 von 9 (Rominger et al., 2024). Dies liegt insbesondere an der fehlenden Reaktortechnologie für den Betrieb im industriellen Maßstab.

In dieser Arbeit konnten einige dieser Herausforderungen angegangen werden. Der kürzlich aus einer Umweltprobe isolierte Organismus *Kyrpidia spormannii* wurde in einem Biofilm-basierten oMES-Prozess unter kontinuierlicher Überwachung der Biofilmdicke kultiviert. Mithilfe einer Modellierung des Prozesses konnte die optimale Gelöstsauerstoffkonzentration für jede Wachstumsphase des Biofilms vorhergesagt werden. Diese konnte im realen Prozess eingestellt und überwacht werden. Es wurde gezeigt, dass ein Potential zwischen -375 mV und -500 mV vs. SHE zu dem schnellsten Biofilmwachstum führt. Die Coulomb'sche Effizienz des Prozesses wurde berechnet. Dabei konnte gezeigt werden, dass am Ende der exponentiellen Wachstumsphase, nachdem der Biofilm die Kathode vollständig bedeckte, eine hundertprozentige Umwandlung der zur Verfügung gestellten Elektronen in Biomasse erfolgte. Im Vergleich mit einem zweistufigen Prozess

zur Produktion von Biomasse aus Wasserstoff konnte gezeigt werden, dass mit der oxischen mikrobiellen Elektrosynthese im Durchschnitt ein ähnlicher, in der effizientesten Wachstumsphase ein geringerer Energiebedarf erreicht werden kann. In dieser, der effizientesten Wachstumsphase, ist der Betrieb einer oxischen mikrobiellen Elektrosynthese im Hinblick auf die Elektroneneffizienz ebenfalls konkurrenzfähig zu einer anoxischen MES. Durch Zugabe eines funktionalisierten Polymers könnte die Biofilmbildung induziert und damit die weniger effiziente Startphase des Biofilmwachstums verkürzt werden. Um die Anforderungen an einen kontinuierlichen Prozess zu erfüllen, wurde eine Erntemethode für den Biofilm entwickelt, bei welcher Teile des Biofilms durch die Entstehung von Wasserstoffblasen nach Anlegen eines stark negativen Potentials von der Kathode abgelöst werden. Es wurde gezeigt, dass sich der Biofilm nach einer solchen teilweisen Ablösung wieder regenerieren kann. Die geerntete Biomasse hat einen hohen Proteingehalt und kann so selbst als Produkt dienen. Zudem ist *K. spormannii* in der Lage, Polyhydroxybuttersäure zu akkumulieren. Derzeit kann diese noch nicht in industriell relevanten Mengen extrahiert werden. Mit einer Strategie zur Verbesserung der Produktion ist diese jedoch ein vielversprechender Kandidat für den Einsatz als Biopolymer. Das Produktspektrum kann jedoch auch durch den Einsatz anderer Organismen oder gezielte genetische Veränderungen der Organismen erweitert werden.

Zuletzt wurde ein möglicher realer Anwendungsfall untersucht, indem das Wachstum von *K. spormannii* auf Rauchgas aus der Müllverbrennung gezeigt wurde. Auch das Wachstum im bioelektrochemischen System mit einer synthetischen Rauchgasmischung konnte nachgewiesen werden. In einer anderen Studie wurde eine oxische mikrobielle Elektrosynthese auf dem Werksgelände eines Blockheizkraftwerks direkt eingesetzt (Langsdorf et al., 2024). Für die tatsächliche industrielle Anwendung fehlt immer noch eine skalierbare Reaktortechnologie, zudem müsste über eine techno-ökonomische Analyse nachgewiesen werden, dass diese auf eine effiziente Weise betrieben werden kann. Dennoch hat die Technologie großes Potential, und die vielen Studien, die in den letzten Jahren insbesondere in Bezug auf eine mögliche Hochskalierung der Prozesse durchgeführt wurden, geben Hoffnung, dass auch diese Herausforderung baldmöglichst gelöst werden kann.

Literaturverzeichnis

- Abdollahi, M., Al Sbei, S., Rosenbaum, M. A., und Harnisch, F. (2022). The oxygen dilemma: The challenge of the anode reaction for microbial electrosynthesis from CO₂. *Frontiers in Microbiology*, 13(8):1–9.
- Adoni, P., Romanyuk, A., Overton, T. W., und Fernandez-Trillo, P. (2022). Polymer-induced biofilms for enhanced biocatalysis. *Materials Horizons*, 9:2592–2602.
- Akouris, P. P., Stuivenberg, G. A., Chmiel, J. A., Kiattiburut, W., Poon, A., Reid, G., und and, J. P. B. (2024). Ethanolamine enhances adhesion, promotes microcompartment formation, and modulates gene expression in *Levilactobacillus brevis* ATCC 14869. *Gut Microbes*, 16(1).
- Aresta, M., Dibenedetto, A., und Angelini, A. (2014). Catalysis for the Valorization of Exhaust Carbon: from CO₂ to Chemicals, Materials, and Fuels. Technological Use of CO₂. *Chemical Reviews*, 114(3):1709–1742.
- Aruna, T. E., Aworh, O. C., Raji, A. O., und Olagunju, A. I. (2017). Protein enrichment of yam peels by fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* BY4743. *Annals of Agricultural Sciences*, 62(1):33–37.
- Balakrishna Pillai, A., Jaya Kumar, A., und Kumarapillai, H. (2018). Enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate) in recombinant *Escherichia coli* and EDTA–microwave-assisted cell lysis for polymer recovery. *AMB Express*, 8(1).
- Bar-Even, A., Noor, E., Lewis, N. E., und Milo, R. (2010). Design and analysis of synthetic carbon fixation pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(19):8889–8894.
- Bar-Even, A., Noor, E., und Milo, R. (2012). A survey of carbon fixation pathways through a quantitative lens. *Journal of Experimental Botany*, 63(6):2325–2342.
- Bard, A. J. und Faulkner, L. R. (2001). *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. Wiley, 2nd edition.
- Bashkatov, A., Park, S., Demirkir, Ç., Wood, J. A., Koper, M. T. M., Lohse, D., und Krug, D. (2024). Performance Enhancement of Electrocatalytic Hydrogen Evolution through Coalescence-Induced Bubble Dynamics. *Journal of the American Chemical Society*, 146(14):10177–10186.
- Baslam, M. und Sanz-Saez, A. (2023). Editorial: Photosynthesis in a changing global climate: A matter of scale, volume II. *Frontiers in Plant Science*, 14.
- Batlle-Vilanova, P., Ganigué, R., Ramió-Pujol, S., Bañeras, L., Jiménez, G., Hidalgo, M., Balaguer, M. D., Colprim, J., und Puig, S. (2017). Microbial electrosynthesis of butyrate from carbon dioxide: Production and extraction. *Bioelectrochemistry*, 117:57–64.
- Batstone, D., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S., Pavlostathis, S., Rozzi, A., Sanders, W., Siegrist, H., und Vavilin, V. (2002). Anaerobic digestion model No 1 (ADM1). *Water science*

- and technology: A journal of the International Association on Water Pollution Research, 45:65–73.
- Berg, I. A. (2011). Ecological aspects of the distribution of different autotrophic CO₂ fixation pathways. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(6):1925–1936.
- Berg, I. A., Kockelkorn, D., Vera, W. H. R., Say, R. F., Zarzycki, J., Hügler, M., Alber, B. E., und Fuchs, G. (2010). Autotrophic carbon fixation in Archaea. *Nature Reviews Microbiology*, 8(6):447–460.
- Blankenship, R. E., Tiede, D. M., Barber, J., Brudvig, G. W., Fleming, G., Ghirardi, M., Gunner, M. R., Junge, W., Kramer, D. M., Melis, A., Moore, T. A., Moser, C. C., Nocera, D. G., Nozik, A. J., Ort, D. R., Parson, W. W., Prince, R. C., und Sayre, R. T. (2011). Comparing Photosynthetic and Photovoltaic Efficiencies and Recognizing the Potential for Improvement. *Science*, 332(6031):805–809.
- Boelee, N. C., Janssen, M., Temmink, H., Taparavičiute, L., Khiewwijit, R., Jánoska, Á., Buisman, C. J., und Wijffels, R. H. (2013). The effect of harvesting on biomass production and nutrient removal in phototrophic biofilm reactors for effluent polishing. *Journal of Applied Phycology*, 26(3):1439–1452.
- Borrel, G., Adam, P. S., und Gribaldo, S. (2016). Methanogenesis and the wood-ljungdahl pathway: An ancient, versatile, and fragile association. *Genome Biology and Evolution*, 8(6):1706–1711.
- Boto, S. T., Bardl, B., Harnisch, F., und Rosenbaum, M. A. (2023). Microbial electrosynthesis with *Clostridium ljungdahlii* benefits from hydrogen electron mediation and permits a greater variety of products. *Green Chemistry*, 25:4375–4386.
- Bouma, B. E. und Tearney, G. J., editors (2001). *Handbook of Optical Coherence Tomography*. Marcel Dekker, New York.
- Bouwer, E. J. und Crowe, P. B. (1988). Biological Processes in Drinking Water Treatment. *Journal AWWA*, 80(9):82–93.
- Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248–254.
- Bratbak, G. und Dundas, I. (1984). Bacterial dry matter content and biomass estimations. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(4):755–757.
- Cabau-Peinado, O., Winkelhorst, M., Stroek, R., de Kat Angelino, R., Straathof, A. J., Masania, K., Daran, J. M., und Jourdin, L. (2024). Microbial electrosynthesis from CO₂ reaches productivity of syngas and chain elongation fermentations. *Trends in Biotechnology*, 42(11):1503–1522.
- Caccavo, F., Lonergan, D. J., Lovley, D. R., Davis, M., Stolz, J. F., und McNerney, M. J. (1994). *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a hydrogen- and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(10):3752–3759.

- Carmo, M., Fritz, D. L., Mergel, J., und Stolten, D. (2013). A comprehensive review on PEM water electrolysis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(12):4901–4934.
- Chassaing, B. und Darfeuille-Michaud, A. (2013). The σ E Pathway Is Involved in Biofilm Formation by Crohn’s Disease-Associated Adherent-Invasive *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 195(1):76–84.
- Chatenet, M., Pollet, B. G., Dekel, D. R., Dionigi, F., Deseure, J., Millet, P., Braatz, R. D., Bazant, M. Z., Eikerling, M., Staffell, I., Balcombe, P., Shao-Horn, Y., und Schäfer, H. (2022). Water electrolysis: from textbook knowledge to the latest scientific strategies and industrial developments. *Chemical Society Reviews*, 51:4583–4762.
- Chen, Y. X., Lavacchi, A., Miller, H. A., Bevilacqua, M., Filippi, J., Innocenti, M., Marchionni, A., Oberhauser, W., Wang, L., und Vizza, F. (2014). Nanotechnology makes biomass electrolysis more energy efficient than water electrolysis. *Nature Communications*, 5(5):1–6.
- Cracknell, J. A., Wait, A. F., Lenz, O., Friedrich, B., und Armstrong, F. A. (2009). A kinetic and thermodynamic understanding of O₂ tolerance in [NiFe]-hydrogenases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(49):20681–20686.
- Crowley, L. C., Scott, A. P., Marfell, B. J., Boughaba, J. A., Chojnowski, G., und Waterhouse, N. J. (2016). Measuring Cell Death by Propidium Iodide Uptake and Flow Cytometry. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(7).
- da Silva, T. L. und Reis, A. (2015). Scale-up Problems for the Large Scale Production of Algae. *Algal Biorefinery: An Integrated Approach*, pages 125–149. Springer International Publishing, Cham.
- Das, S., Das, I., und Ghangrekar, M. M. (2020). Role of applied potential on microbial electrosynthesis of organic compounds through carbon dioxide sequestration. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(4).
- Das, S., Das, S., und Ghangrekar, M. (2021). Application of TiO₂ and Rh as cathode catalyst to boost the microbial electrosynthesis of organic compounds through CO₂ sequestration. *Process Biochemistry*, 101:237–246.
- Das, S. und Ghangrekar, M. M. (2018). Value added product recovery and carbon dioxide sequestration from biogas using microbial electrosynthesis. *Indian Journal of Experimental Biology*, 56(7):470–478.
- Dessi, P., Rovira-Alsina, L., Sánchez, C., Dinesh, G. K., Tong, W., Chatterjee, P., Tedesco, M., Farràs, P., Hamelers, H. M., und Puig, S. (2021). Microbial electrosynthesis: Towards sustainable biorefineries for production of green chemicals from CO₂ emissions. *Biotechnology Advances*, 46(7).
- Deutzmann, J. S., Sahin, M., und Spormann, A. M. (2015). Extracellular Enzymes Facilitate Electron Uptake in Biocorrosion and Bioelectrosynthesis. *mBio*, 6(2).
- Deutzmann, J. S. und Spormann, A. M. (2017). Enhanced microbial electrosynthesis by using defined co-cultures. *ISME Journal*, 11(3):704–714.

- Duluins, O. und Baret, P. V. (2024). A systematic review of the definitions, narratives and paths forwards for a protein transition in high-income countries. *Nature Food*, 5(1):28–36.
- Elisiário, M. P., De Wever, H., Van Hecke, W., Noorman, H., und Straathof, A. J. (2022). Membrane bioreactors for syngas permeation and fermentation. *Critical Reviews in Biotechnology*, 42(6):856–872.
- Éva, C., Oszvald, M., und Tamás, L. (2019). Current and possible approaches for improving photosynthetic efficiency. *Plant Science*, 280:433–440.
- Fan, Q., Ning, M., Zeng, X., He, X., Bai, Z., Gu, S., Yuan, Y., und Yue, T. (2025). Anti-*Vibrio parahaemolyticus* Mechanism of Hexanal and Its Inhibitory Effect on Biofilm Formation. *Foods*, 14(4).
- Fischer, F. und Tropsch, H. (1927). Über die Synthese hochmolekularer Paraffin-Kohlenwasserstoffe aus Kohlenoxyd. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)*, 60(6):1330–1334.
- Flemming, H. C. und Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9):623–633.
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., und Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9):563–575.
- Flexer, V. und Jourdin, L. (2020). Purposely Designed Hierarchical Porous Electrodes for High Rate Microbial Electrosynthesis of Acetate from Carbon Dioxide. *Accounts of Chemical Research*, 53(2):311–321. PMID: 31990521.
- Friedlingstein, P. (2015). Carbon cycle feedbacks and future climate change. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 373.
- Fruehauf, H. M., Enzmann, F., Harnisch, F., Ulber, R., und Holtmann, D. (2020). Microbial Electrosynthesis - An Inventory on Technology Readiness Level and Performance of Different Process Variants. *Biotechnology Journal*, 15(10):1–11.
- Fuchs, G. (2011). Alternative pathways of carbon dioxide fixation: Insights into the early evolution of life? *Annual Review of Microbiology*, 65:631–658.
- Ganigué, R., Puig, S., Batlle-Vilanova, P., Balaguer, M. D., und Colprim, J. (2015). Microbial electrosynthesis of butyrate from carbon dioxide. *Chemical Communications*, 51(15):3235–3238.
- Golitsch, F., Bücking, C., und Gescher, J. (2013). Proof of principle for an engineered microbial biosensor based on *Shewanella oneidensis* outer membrane protein complexes. *Biosensors and Bioelectronics*, 47:285–291.
- Gregory, K. B., Bond, D. R., und Lovley, D. R. (2004). Graphite electrodes as electron donors for anaerobic respiration. *Environmental Microbiology*, 6(6):596–604.

- Grootscholten, T., Steinbusch, K., Hamelers, H., und Buisman, C. (2013). Chain elongation of acetate and ethanol in an upflow anaerobic filter for high rate MCFA production. *Bioresource Technology*, 135:440–445.
- Guo, L., Zhang, C., Chen, G., Wu, M., Liu, W., Ding, C., Dong, Q., Fan, E., und Liu, Q. (2019). Reactive oxygen species inhibit biofilm formation of *Listeria monocytogenes*. *Microbial Pathogenesis*, 127:183–189.
- Hackbarth, M., Gescher, J., Horn, H., und 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(11).
- Hackbarth, M., Jung, T., Reiner, J. E., Gescher, J., Horn, H., Hille-Reichel, A., und Wagner, M. (2020). Monitoring and quantification of bioelectrochemical *Kyrpidia spormannii* biofilm development in a novel flow cell setup. *Chemical Engineering Journal*, 390(12).
- Halan, B., Buehler, K., und Schmid, A. (2012). Biofilms as living catalysts in continuous chemical syntheses. *Trends in Biotechnology*, 30(9):453–465.
- Hamon, M. A. und Lazazzera, B. A. (2001). The sporulation transcription factor Spo0A is required for biofilm development in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 42(5):1199–1209.
- Haynes, W. M., editor (2016). *Handbook of Chemistry and Physics*. CRC Press.
- Henry, R. J. (2010). Evaluation of plant biomass resources available for replacement of fossil oil. *Plant Biotechnology Journal*, 8(3):288–293.
- Henry, W. und Banks, J. (1803). III. Experiments on the quantity of gases absorbed by water, at different temperatures, and under different pressures. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 93:29–274.
- Henze, M., Gujer, W., Mino, T., und van Loosedrecht, M. (2006). *Activated Sludge Models ASM1, ASM2, ASM2d and ASM3*. IWA Publishing.
- Hertwich, E. G. (2021). Increased carbon footprint of materials production driven by rise in investments. *Nature Geoscience*, 14(3):151–155.
- Hofmann, D. J., Butler, J. H., Dlugokencky, E. J., Elkins, J. W., Masarie, K., Montzka, S. A., und Tans, P. (2006). The role of carbon dioxide in climate forcing from 1979 to 2004: Introduction of the Annual Greenhouse Gas Index. *Tellus, Series B: Chemical and Physical Meteorology*, 58(5):614–619.
- Hogendoorn, C., Pol, A., Picone, N., Cremers, G., Alen, T. A. V., und Camp, H. J. M. O. D. (2020). Hydrogen and Carbon Monoxide-Utilizing *Kyrpidia spormannii* Species From Pantelleria. *Frontiers in Microbiology*, 11(May):1–13.
- Horn, H. und Morgenroth, E. (2006). Transport of oxygen, sodium chloride, and sodium nitrate in biofilms. *Chemical Engineering Science*, 61(5):1347–1356.
- Hou, Y. und Wu, G. (2018). Nutritionally Essential Amino Acids. *Advances in Nutrition*, 9(6):849–851.

- Huang, D., Swanson, E. A., Lin, C. P., Schuman, J. S., Stinson, W. G., Chang, W., Hee, M. R., Flotte, T., Gregory, K., Puliafito, C. A., und Fujimoto, J. G. (1991). Optical Coherence Tomography. *Science*, 254(5035):1178–1181.
- Hui, S., Jiang, Y., Jiang, Y., Lyu, Z., Ding, S., Song, B., Zhu, W., und Zhu, J.-J. (2023). Cathode materials in microbial electrosynthesis systems for carbon dioxide reduction: recent progress and perspectives. *Energy Materials*, 3(6).
- Inderwildi, O. R., Jenkins, S. J., und King, D. A. (2008). Fischer-Tropsch mechanism revisited: Alternative pathways for the production of higher hydrocarbons from synthesis gas. *Journal of Physical Chemistry C*, 112(5):1305–1307.
- Jajesniak, P., Ali, H. E. M. O., und Wong, T. S. (2014). Carbon Dioxide Capture and Utilization using Biological Systems: Opportunities and Challenges. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 04(03).
- Jan, S., Roblot, C., Courtois, J., Courtois, B., Barbotin, J. N., und Séguin, J. P. (1996). ^1H NMR spectroscopic determination of poly 3-hydroxybutyrate extracted from microbial biomass. *Enzyme and Microbial Technology*, 18(3):195–201.
- Joshi, S., Robles, A., Aguiar, S., und Delgado, A. G. (2021). The occurrence and ecology of microbial chain elongation of carboxylates in soils. *The ISME Journal*, 15(7):1907–1918.
- Jung, T. (2020). Analysen zur Substrataufnahme und Produktbildung des elektroautotrophen Biokatalysators *Kyrpidia spormannii*. Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie.
- Jung, T., Hackbarth, M., Horn, H., und Gescher, J. (2021). Improving the Cathodic Biofilm Growth Capabilities of *Kyrpidia spormannii* EA-1 by Undirected Mutagenesis. *Microorganisms*, 9(77):1–15.
- Junge, W. (2019). Oxygenic photosynthesis: history, status and perspective. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 52.
- Kajla, S., Kumari, R., und Nagi, G. K. (2022). Microbial CO_2 fixation and biotechnology in reducing industrial CO_2 emissions. *Archives of Microbiology*, 204(2):1–20.
- Kaltschmitt, M., Hartmann, H., Posten, C., und Wilhelm, C. (2016). Aquatische Biomasse. In *Energie aus Biomasse*, chapter 5, pages 249–277. Hofbauer, Hermann, Heidelberg, 3 edition.
- Kaval, K. G. und Garsin, D. A. (2018). Ethanolamine Utilization in Bacteria. *mBio*, 9(1):10.1128/mbio.00066–18.
- Khan, M. I., Shin, J. H., und Kim, J. D. (2018). The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial Cell Factories*, 17(1):1–21.
- Kim, Y., Wang, X., Ma, Q., Zhang, X.-S., und Wood, T. K. (2009). Toxin-Antitoxin Systems in *Escherichia coli* influence Biofilm Formation through YjgK (TabA) and Fimbriae. *Journal of Bacteriology*, 191(4):1258–1267.

- Kircher, M. und Schwarz, T. (2020). CO₂ und CO - Nachhaltige Kohlenstoffquellen für die Kreislaufwirtschaft. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg.
- Koch, T., Scheelhaase, T., Jonas, N., Hungsberg, M., und Osswald, D. (2016). Evaluation zur Nutzung von Kohlendioxid (CO₂) als Rohstoff in der Emscher-Lippe-Region - Erstellung einer Potentialanalyse. Technical report, EPEA - Internationale Umweltforschung GmbH, Hamburg.
- Korth, B., Rosa, L. F., Harnisch, F., und Picioreanu, C. (2015). A framework for modeling electroactive microbial biofilms performing direct electron transfer. *Bioelectrochemistry*, 106:194–206.
- Kracke, F., Deutzmann, J. S., Gu, W., und Spormann, A. M. (2020). In-situ electrochemical H₂ production for efficient and stable power-to-gas electromethanogenesis. *Green Chemistry*, 22(18):6194–6203.
- Kracke, F., Vassilev, I., und Krömer, J. O. (2015). Microbial electron transport and energy conservation - The foundation for optimizing bioelectrochemical systems. *Frontiers in Microbiology*, 6(575):1–18.
- Kruse, D., Kiep, K., und Schäffner, B. (2015). CO₂-Abtrennung und -Nutzung. CO₂: Abtrennung, Speicherung, Nutzung: Ganzheitliche Bewertung im Bereich von Energiewirtschaft und Industrie, pages 511–567. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- LaBelle, E. V. und May, H. D. (2017). Energy efficiency and productivity enhancement of microbial electrosynthesis of acetate. *Frontiers in Microbiology*, 8(5):1–9.
- Langsdorf, A., Schütz, J. P., Ulber, R., Stöckl, M., und Holtmann, D. (2024). Production of polyhydroxybutyrate from industrial flue gas by microbial electrosynthesis. *Journal of CO₂ Utilization*, 83(4).
- Lenz, O., Ludwig, M., Schubert, T., Bürstel, I., Ganskow, S., Goris, T., Schwarze, A., und Friedrich, B. (2010). H₂ Conversion in the Presence of O₂ as Performed by the Membrane-Bound [NiFe]-Hydrogenase of *Ralstonia eutropha*. *ChemPhysChem*, 11(6):1107–1119.
- Leonov, P. S., Flores-Alsina, X., Gernaey, K. V., und Sternberg, C. (2021). Microbial biofilms in biorefinery – Towards a sustainable production of low-value bulk chemicals and fuels. *Biotechnology Advances*, 50:107766.
- Lepidi, A. A., Casella, S., Toffanin, A., Petrassi, S., und Nuti, M. P. (1990). Hydrogen-oxidizing bacteria for biomass production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 15(7):485–489.
- Lieth, H. und Whittaker, R. H., editors (1975). Measurement of Caloric Values. Primary Productivity of the Biosphere, pages 119–129. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Lin, L., Huang, H., Zhang, X., Dong, L., und Chen, Y. (2022). Hydrogen-oxidizing bacteria and their applications in resource recovery and pollutant removal. *Science of The Total Environment*, 835.
- Liu, Y., Wang, L., Ma, Q., Xu, X., Gao, X., Zhu, H., Feng, T., Dou, X., Eguchi, M., Yamauchi, Y., und Yuan, X. (2024). Simultaneous generation of residue-free reactive oxygen species

- and bacteria capture for efficient electrochemical water disinfection. *Nature Communications*, 15(1).
- Logan, B. E., Rossi, R., Ragab, A., und Saikaly, P. E. (2019). Electroactive microorganisms in bioelectrochemical systems. *Nature Reviews Microbiology*, 17(5):307–319.
- Lu, Y. und Yu, J. (2017). Comparison analysis on the energy efficiencies and biomass yields in microbial CO₂ fixation. *Process Biochemistry*, 62(2):151–160.
- Mai-Prochnow, A., Webb, J. S., Ferrari, B. C., und Kjelleberg, S. (2006). Ecological Advantages of Autolysis during the Development and Dispersal of *Pseudoalteromonas tunicata* Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8):5414–5420.
- Marcellin, E., Angenent, L. T., Nielsen, L. K., und Molitor, B. (2022). Recycling carbon for sustainable protein production using gas fermentation. *Current Opinion in Biotechnology*, 76.
- Marshall, C. W., Ross, D. E., Fichot, E. B., Norman, R. S., und May, H. D. (2012). Electro-synthesis of Commodity Chemicals by an Autotrophic Microbial Community. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(23):8412–8420.
- Marshall, C. W., Ross, D. E., Handley, K. M., Weisenhorn, P. B., Edirisinghe, J. N., Henry, C. S., Gilbert, J. A., May, H. D., und Norman, R. S. (2017). Metabolic reconstruction and modeling microbial electrosynthesis. *Scientific Reports*, 7(1):1–12.
- Martin, K. J. und Nerenberg, R. (2012). The membrane biofilm reactor (MBfR) for water and wastewater treatment: Principles, applications, and recent developments. *Bioresource Technology*, 122:83–94.
- Mason-Jones, K., Breidenbach, A., Dyckmans, J., Banfield, C. C., und Dippold, M. A. (2023). Intracellular carbon storage by microorganisms is an overlooked pathway of biomass growth. *Nature Communications*, 14(1):1–9.
- Mason-Jones, K., Robinson, S. L., Veen, G. F. C., Manzoni, S., und van der Putten, W. H. (2021). Microbial storage and its implications for soil ecology. *The ISME Journal*, 16(3):617–629.
- Massazza, D., Robledo, A. J., Rodriguez Simón, C. N., Busalmen, J. P., und Bonanni, S. (2021). Energetics, electron uptake mechanisms and limitations of electroautotrophs growing on biocathodes – A review. *Bioresource Technology*, 342(8).
- Matassa, S., Verstraete, W., Pikaar, I., und Boon, N. (2016). Autotrophic nitrogen assimilation and carbon capture for microbial protein production by a novel enrichment of hydrogen-oxidizing bacteria. *Water Research*, 101:137–146.
- Matsumura, K., Furukawa, S., und Yasushi Morinaga, H. O. (2011). Roles of Multidrug Efflux Pumps on the Biofilm Formation of *Escherichia coli* K-12. *Biocontrol Science*, 16(2):69–72.
- McAdam, B., Fournet, M. B., McDonald, P., und Mojicevic, M. (2020). Production of polyhydroxybutyrate (PHB) and factors impacting its chemical and mechanical characteristics. *Polymers*, 12(12):1–20.

- McKinlay, J. B. und Harwood, C. S. (2011). Calvin Cycle Flux, Pathway Constraints, and Substrate Oxidation State Together Determine the H₂ Biofuel Yield in Photoheterotrophic Bacteria. *mBio*, 2(2).
- Mishra, A., Ntihuga, J. N., Molitor, B., und Angenent, L. T. (2020). Power-to-Protein: Carbon Fixation with Renewable Electric Power to Feed the World. *Joule*, 4(6):1142–1147.
- Miyahara, Y., Wang, C.-T., Ishii-Hyakutake, M., und Tsuge, T. (2022). Continuous Supply of Non-Combustible Gas Mixture for Safe Autotrophic Culture to Produce Polyhydroxyalkanoate by Hydrogen-Oxidizing Bacteria. *Bioengineering*, 9(10).
- Mota, F. M. und Kim, D. H. (2019). From CO₂ methanation to ambitious long-chain hydrocarbons: Alternative fuels paving the path to sustainability. *Chemical Society Reviews*, 48(1):205–259.
- Nerenberg, R. (2016). The membrane-biofilm reactor (MBfR) as a counter-diffusional biofilm process. *Current Opinion in Biotechnology*, 38:131–136.
- Nevin, K. P., Hensley, S. A., Franks, A. E., Summers, Z. M., Ou, J., Woodard, T. L., Snoeyenbos-West, O. L., und 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.
- Pander, B., Mortimer, Z., Woods, C., McGregor, C., Dempster, A., Thomas, L., Maliepaard, J., Mansfield, R., Rowe, P., und Krabben, P. (2020). Hydrogen oxidising bacteria for production of single-cell protein and other food and feed ingredients. *Engineering Biology*, 4(2):21–24.
- Peña, C., Castillo, T., García, A., Millán, M., und Segura, D. (2014). Biotechnological strategies to improve production of microbial poly-(3-hydroxybutyrate): a review of recent research work. *Microbial Biotechnology*, 7(4):278–293.
- Philips, J. (2020). Extracellular Electron Uptake by Acetogenic Bacteria: Does H₂ Consumption Favor the H₂ Evolution Reaction on a Cathode or Metallic Iron? *Frontiers in Microbiology*, 10(1):1–13.
- Philips, J., Verbeeck, K., Rabaey, K., und Arends, J. B. (2016). *Electron Transfer Mechanisms in Biofilms*. Elsevier Ltd., Philips2016.
- Picioreanu, C., Van Loosdrecht, M. C., und Heijnen, J. J. (1998). Mathematical modeling of biofilm structure with a hybrid differential-discrete cellular automaton approach. *Biotechnology and Bioengineering*, 58(1):101–116.
- Pillot, G., Sunny, S., Comes, V., Heussner, A., und Kerzenmacher, S. (2022a). Effect of cathode properties on the thermophilic electrosynthesis of Polyhydroxyalkanoates by *Kyrpidia spormannii*. *Bioresource Technology Reports*, 18(4).
- Pillot, G., Sunny, S., Comes, V., und Kerzenmacher, S. (2022b). Optimization of growth and electrosynthesis of PolyHydroxyAlkanoates by the thermophilic bacterium *Kyrpidia spormannii*. *Bioresource Technology Reports*, 17.

- Porter, R. T., Fairweather, M., Pourkashanian, M., und Woolley, R. M. (2015). The range and level of impurities in CO₂ streams from different carbon capture sources. *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 36:161–174.
- Pous, N., Balaguer, M. D., Matassa, S., Chiluiza-Ramos, P., Bañeras, L., und Puig, S. (2022). Electro-cultivation of hydrogen-oxidizing bacteria to accumulate ammonium and carbon dioxide into protein-rich biomass. *Bioresource Technology Reports*, 18(12):1–9.
- PrévotEAU, A., Carvajal-Arroyo, J. M., Ganigué, R., und Rabaey, K. (2020). Microbial electro-synthesis from CO₂: forever a promise? *Current Opinion in Biotechnology*, 62:48–57.
- Rabaey, K., Boon, N., Siciliano, S. D., Verhaege, M., und Verstraete, W. (2004). Biofuel cells select for microbial consortia that self-mediate electron transfer. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(9):5373 – 5382.
- Rabaey, K. und Rozendal, R. A. (2010). Microbial electrosynthesis - Revisiting the electrical route for microbial production. *Nature Reviews Microbiology*, 8(10):706–716.
- Ragab, A., Shaw, D. R., Katuri, K. P., und Saikaly, P. E. (2020). Effects of set cathode potentials on microbial electrosynthesis system performance and biocathode methanogen function at a metatranscriptional level. *Scientific Reports*, 10(1):1–15.
- Ragsdale, S. W. und Pierce, E. (2008). Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO₂ fixation. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1784(12):1873–1898.
- Rampersad, S. N. (2012). Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. *Sensors*, 12(9):12347–12360.
- Reasoner, D. J. und Geldreich, E. E. (1985). A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(1):1–7.
- Reiner, J. E., Geiger, K., Hackbarth, M., Fink, M., Lapp, C. J., Jung, T., Dötsch, A., Hügler, M., Wagner, M., Hille-Reichel, A., Willeke, W., Kerzenmacher, S., Horn, H., und Gescher, J. (2020). From an extremophilic community to an electroautotrophic production strain: identifying a novel Knallgas bacterium as cathodic biofilm biocatalyst. *ISME Journal*, 14(5):1125–1140.
- Reiner, J. E., Korth, B., und Edel, M. (2024). Oxygen In The Mix: Is Oxidic Microbial Electro-synthesis A Potential Alternative For Biomass Production? *ChemElectroChem*, 11(20).
- Rheinländer, P. J., Herranz, J., Durst, J., und Gasteiger, H. A. (2014). Kinetics of the Hydrogen Oxidation/Evolution Reaction on Polycrystalline Platinum in Alkaline Electrolyte Reaction Order with Respect to Hydrogen Pressure. *Journal of The Electrochemical Society*, 161(14).
- Rominger, L. (2020). Bioelektrochemische Prozessoptimierung für die kathodengetriebene mikrobielle Produktion von Wertstoffen. Masterarbeit, Karlsruher Institut für Technologie.
- Rominger, L., Hackbarth, M., Jung, T., Scherzinger, M., Rosa, L. F. M., Horn, H., Kaltschmitt, M., Picioreanu, C., und Gescher, J. (2024). Efficiency and process development for microbial biomass production using oxidic bioelectrosynthesis. *Trends in biotechnology*, 43(3):673–695.

- Rosenbaum, M. A., Schröder, U., und Harnisch, F. (2013). Mikroben unter Strom. *Biologie unserer Zeit*, 2013(43):96–103.
- Ross, D. E., Flynn, J. M., Baron, D. B., Gralnick, J. A., und Bond, D. R. (2011). Towards Electrosynthesis in *Shewanella*: Energetics of Reversing the Mtr Pathway for Reductive Metabolism. *PLOS ONE*, 6(2):1–9.
- Rowe, A. R., Rajeev, P., Jain, A., Pirbadian, S., Okamoto, A., Gralnick, J. A., El-Naggar, M. Y., und Nealson, K. H. (2018). Tracking Electron Uptake from a Cathode into *Shewanella* Cells: Implications for Energy Acquisition from Solid-Substrate Electron Donors. *mBio*, 9(1).
- Roy, M., Yadav, R., Chiranjeevi, P., und Patil, S. A. (2021). Direct utilization of industrial carbon dioxide with low impurities for acetate production via microbial electrosynthesis. *Bioresource Technology*, 320(8).
- Rozendal, R. A., Jeremiase, A. W., Hamelers, H. V. M., und Buisman, C. J. N. (2008). Hydrogen Production with a Microbial Biocathode. *Environmental Science & Technology*, 42(2):629–634.
- Salehizadeh, H., Yan, N., und Farnood, R. (2020). Recent advances in microbial CO₂ fixation and conversion to value-added products. *Chemical Engineering Journal*, 390(2).
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., und Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7):676–682.
- Schlegel, H. G. und Lafferty, R. (1965). Growth of 'Knallgas' Bacteria (*Hydrogenomonas*) using Direct Electrolysis of the Culture Medium. *Nature*, 205:308–309.
- Schmeckebier, A., Zayed, A., und Ulber, R. (2022). Productive biofilms: from prokaryotic to eukaryotic systems. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 97(11):3049–3064.
- Schmid, A., Doderick, J. S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., und Witholt, B. (2001). Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 409(1):258–268.
- Schmidt-Rohr, K. (2020). Oxygen Is the High-Energy Molecule Powering Complex Multicellular Life: Fundamental Corrections to Traditional Bioenergetics. *ACS Omega*, 5(5):2221–2233.
- Schuchmann, K. und Müller, V. (2014). Autotrophy at the thermodynamic limit of life: A model for energy conservation in acetogenic bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 12(12):809–821.
- Schwander, T., von Borzyskowski, L. S., Burgener, S., Cortina, N. S., und Erb, T. J. (2016). A synthetic pathway for the fixation of carbon dioxide in vitro. *Science*, 354:900–904.
- Sei Kwang Hahn, Yong Keun Chang, und Sang Yup Lee (1995). Recovery and characterization of poly(3-hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and recombinant *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(1):34–39.
- Sharif, M., Zafar, M. H., Aqib, A. I., Saeed, M., Farag, M. R., und Alagawany, M. (2021). Single cell protein: Sources, mechanism of production, nutritional value and its uses in aquaculture nutrition. *Aquaculture*, 531(7).

- Shi, L., Squier, T. C., Zachara, J. M., und Fredrickson, J. K. (2007). Respiration of metal (hydr)oxides by *Shewanella* and *Geobacter*: a key role for multihaem *c*-type cytochromes. *Molecular Microbiology*, 65(1):12–20.
- Sillman, J., Nygren, L., Kahiluoto, H., Ruuskanen, V., Tamminen, A., Bajamundi, C., Nappa, M., Wuokko, M., Lindh, T., Vainikka, P., Pitkänen, J. P., und Ahola, J. (2019). Bacterial protein for food and feed generated via renewable energy and direct air capture of CO₂: Can it reduce land and water use? *Global Food Security*, 22(9):25–32.
- Stadlmayr, W. (2018). Die ideale Gasgleichung. *Thermodynamik - nicht nur für Nerds: Grundlagen der Thermodynamik mit Übungen und Beispielen*, pages 43–53. Springer Fachmedien Wiesbaden, Wiesbaden.
- Stewart, P. S. und Stewart, P. S. (2012). Mini-review: Convection around biofilms. *Biofouling - The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 28(2):187–198.
- Surman, S., Walker, J., Goddard, D., Morton, L., Keevil, C., Weaver, W., Skinner, A., Hanson, K., Caldwell, D., und Kurtz, J. (1996). Comparison of microscope techniques for the examination of biofilms. *Journal of Microbiological Methods*, 25(1):57–70.
- Tan, J. S., Lee, S. Y., Chew, K. W., Lam, M. K., Lim, J. W., Ho, S. H., und Show, P. L. (2020). A review on microalgae cultivation and harvesting, and their biomass extraction processing using ionic liquids. *Bioengineered*, 11(1):116–129.
- Thabit, Q., Nassour, A., und Nelles, M. (2022). Flue Gas Composition and Treatment Potential of a Waste Incineration Plant. *Applied Sciences*, 12(10).
- Todhanakasem, T., Sangsutthiseree, A., Areerat, K., Young, G. M., und Thanonkeo, P. (2014). Biofilm production by *Zymomonas mobilis* enhances ethanol production and tolerance to toxic inhibitors from rice bran hydrolysate. *New Biotechnology*, 31(5):451–459.
- Toscano, G., Riva, G., Pedretti, E. F., und Duca, D. (2012). Effect of the carbon oxidation state of biomass compounds on the relationship between GCV and carbon content. *Biomass and Bioenergy*, 48:231–238.
- Tremblay, P. L., Angenent, L. T., und Zhang, T. (2017). Extracellular Electron Uptake: Among Autotrophs and Mediated by Surfaces. *Trends in Biotechnology*, 35(4):360–371.
- Tremblay, P.-L., Faraghiparapari, N., und Zhang, T. (2019). Accelerated H₂ Evolution during Microbial Electrosynthesis with *Sporomusa ovata*. *Catalysts*, 9(2).
- Vassilev, I., Dessi, P., Puig, S., und Kokko, M. (2022). Cathodic biofilms – A prerequisite for microbial electrosynthesis. *Bioresource Technology*, 348(1).
- Vassilev, I., Hernandez, P. A., Batlle-Vilanova, P., Freguia, S., Krömer, J. O., Keller, J., Ledezma, P., und Viridis, B. (2018). Microbial Electrosynthesis of Isobutyric, Butyric, Caproic Acids, and Corresponding Alcohols from Carbon Dioxide. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 6(7):8485–8493.

- Venkateswari, R. und Sreejith, S. (2019). Factors influencing the efficiency of photovoltaic system. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 101:376–394.
- Vignais, P. M. (2008). Hydrogenases and H⁺-Reduction in Primary Energy Conservation. *Bioenergetics: Energy Conservation and Conversion*, pages 223–252. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Wagner, M. und Horn, H. (2017). Optical coherence tomography in biofilm research: A comprehensive review. *Biotechnology and Bioengineering*, 114(7):1386–1402.
- Wagner, M., Taherzadeh, D., Haisch, C., und Horn, H. (2010). Investigation of the mesoscale structure and volumetric features of biofilms using Optical Coherence Tomography. *Biotechnology and Bioengineering*, 107(5):844–853.
- Wang, F. und Lee, S. Y. (1997). Poly(3-Hydroxybutyrate) Production with High Productivity and High Polymer Content by a Fed-Batch Culture of *Alcaligenes latus* under Nitrogen Limitation. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(9):3703–3706.
- Weiler, J., Edel, M., und Gescher, J. (2024). Biofilms for Production of Chemicals and Energy. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 15(1):361–387.
- Wilhelm, C., Weinberg, J., und Kaltschmitt, M. (2014). Conversion steps in bioenergy production - Analysis of the energy flow from photon to biofuel. *Biofuels*, 5(4):385–404.
- Wilson, W., Wade, M. M., Holman, S. C., und Champlin, F. R. (2001). Status of methods for assessing bacterial cell surface charge properties based on zeta potential measurements. *Journal of Microbiological Methods*, 43(3):153–164.
- Wolosiuk, R. A., Ballicora, M. A., und Hagelin, K. (1993). The reductive pentose phosphate cycle for photosynthetic CO₂ assimilation: enzyme modulation. *The FASEB Journal*, 7(8):622–637.
- Wu, Y., Xu, W., Xie, P., Yu, L., Dan, Z., An, W., Luo, L., und Sun, X. (2025). Growth kinetics of electrochemically generated hydrogen bubbles at increased pressures. *Droplet*, 4(2):2769–2159.
- Yu, J., Dow, A., und Pingali, S. (2013). The energy efficiency of carbon dioxide fixation by a hydrogen-oxidizing bacterium. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(21):8683–8690.
- Zanon-Zotin, M., Baptista, L. B., Draeger, R., Rochedo, P. R. R., Szklo, A., und Schaeffer, R. (2024). Unaddressed non-energy use in the chemical industry can undermine fossil fuels phase-out. *Nature Communications*, 15.
- Zhang, L., Jiang, Z., Tsui, T.-H., Loh, K.-C., Dai, Y., und Tong, Y. W. (2022). A Review on Enhancing *Cupriavidus necator* Fermentation for Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) Production From Low-Cost Carbon Sources. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10.
- Zhang, M. und Yu, Y. (2013). Dehydration of Ethanol to Ethylene. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 52(28):9505–9514.
- Zhang, Y., Zhang, C., Du, X., Zhou, Y., Kong, W., Lau, G. W., Chen, G., Kohli, G. S., Yang, L., Wang, T., und Liang, H. (2019). Glutathione Activates Type III Secretion System Through Vfr in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9.

Zheng, Y., Zhang, W., Li, Y., Chen, J., Yu, B., Wang, J., Zhang, L., und Zhang, J. (2017). Energy related CO₂ conversion and utilization: Advanced materials/nanomaterials, reaction mechanisms and technologies. *Nano Energy*, 40:512–539.

Anhang

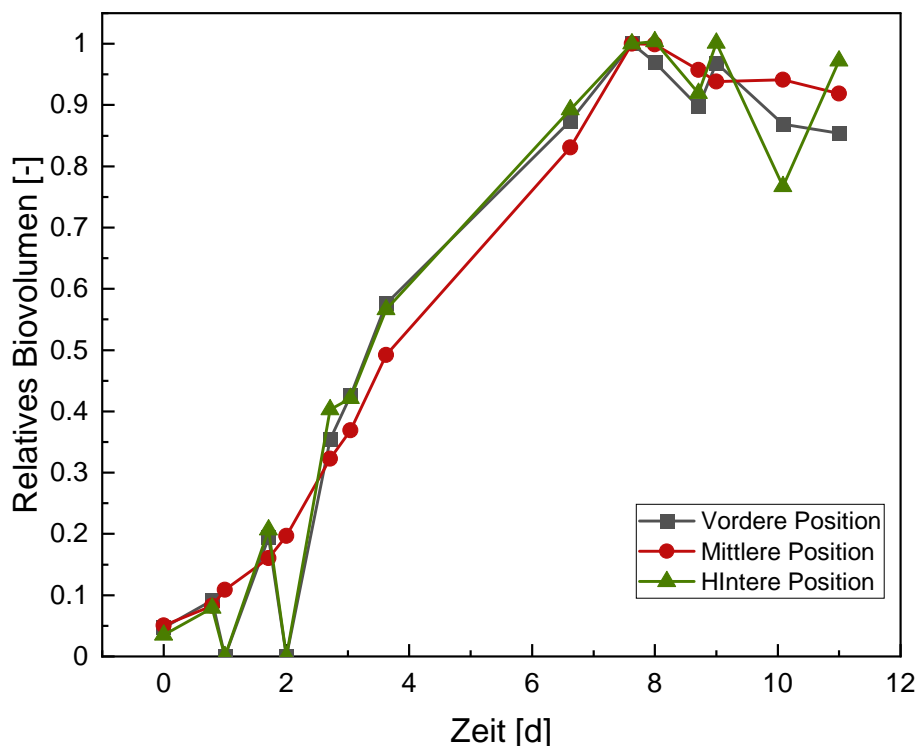


Abbildung A1: Exemplarischer Verlauf des Biovolumens an allen drei Positionen über die Zeit. Abgesehen von wenigen Ausreißern sind sich die Verläufe an allen drei Positionen ähnlich, weshalb in dieser Arbeit zur besseren Vergleichbarkeit stets nur auf die mittlere Position eingegangen wurde.

Tabelle A1: Liste aller relevant hoch- oder herunterregulierten Gene. Es wurden sämtliche Gene gelistet, die in einer der untersuchten Bedingungen (Polymer funktionalisiert mit Aldehyd B, C oder K) in Bezug auf die Referenz um mindestens einen Faktor drei hoch- oder herunterreguliert wurden. Die NCBI ID beschreibt die Funktion des Proteins, für welches das Gen codiert.

Name	NCBI ID	B vs. Ref	C vs. Ref	K vs. Ref
CVV65_02300	ArsR family transcriptional regulator	24,63	27,16	20,34
CVV65_02295	hypothetical protein	10,99	14,77	12,6
CVV65_10395	YhfH family protein	28,34	14,56	16,64
CVV65_02290	hypothetical protein	11,25	14,35	16,32
CVV65_05965	DUF2255 domain-containing protein	3,42	12,03	5,18

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Name	NCBI ID	B vs. Ref	C vs. Ref	K vs. Ref
CVV65_02345	hypothetical protein	11,01	11,24	9,12
CVV65_14640	hypothetical protein	23,57	10,95	13,33
CVV65_13555	hypothetical protein	16,56	10,12	10,54
CVV65_10140	hypothetical protein	10,76	9,23	7,91
CVV65_02270	sporulation protein	9,02	9,18	8,45
CVV65_11030	hypothetical protein	8,41	9,09	6,85
CVV65_11025	sporulation protein	7,26	8,97	5,92
CVV65_06570	cold-shock protein	13,64	8,88	8,38
CVV65_05675	type II toxin-antitoxin system death-on-curing family toxin	10,19	8,29	5,87
CVV65_06080	haloacid dehalogenase type II	8,94	8,17	5,38
CVV65_02390	hypothetical protein	7,85	7,88	6,69
CVV65_13560	hypothetical protein	6,63	7,57	6,53
CVV65_02335	hypothetical protein	5,99	7,54	5,49
CVV65_02285	RNA polymerase subunit sigma-24	5,29	7,52	6,84
CVV65_02340	group II intron reverse transcriptase/maturase	8,01	6,76	6,48
CVV65_06075	mercury(II) reductase	8,2	6,66	5,4
CVV65_06255	hypothetical protein	5,26	6,53	3,52
CVV65_02350	group II intron reverse transcriptase/maturase	5,69	6,44	5,69
CVV65_01535	copper oxidase	8	6,41	5,2
CVV65_14655	transposase	8,56	6,39	5,68
CVV65_02275	hypothetical protein	5,08	6,38	6,03
CVV65_05615	hypothetical protein	8,05	6,38	6,4
CVV65_06170	hypothetical protein	8,91	6,16	4,18
CVV65_02385	hypothetical protein	5,34	5,97	6,8
CVV65_14010	glutathione ABC transporter permease GsiC	4,37	5,96	5,04
CVV65_13565	hypothetical protein	7,41	5,91	5,5
CVV65_09955	alpha/beta hydrolase	5,64	5,81	4,67
CVV65_10135	hypothetical protein	7,11	5,8	5,29
CVV65_03495	ABC transporter permease	4,45	5,74	5,31
CVV65_02280	hypothetical protein	4,72	5,7	6,17
CVV65_14000	peptide ABC transporter ATP-binding protein	5,45	5,68	6,06
CVV65_03875	type I glutamate-ammonia ligase	5,29	5,59	4,65
CVV65_01750	glycosyltransferase family 2 protein	6,83	5,52	4,35
CVV65_02605	type I glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	4,54	5,41	4,91

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Name	NCBI ID	B vs. Ref	C vs. Ref	K vs. Ref
CVV65_00055	IMP dehydrogenase	5,66	5,37	5,37
CVV65_11470	acetolactate synthase small subunit	4,87	5,34	5,53
CVV65_05485	hypothetical protein	6,01	5,32	4,25
CVV65_06085	hypothetical protein	5,2	5,31	3,46
CVV65_05695	hypothetical protein	4,86	5,14	4,45
CVV65_15460	hypothetical protein	6,29	5	4,86
CVV65_13995	peptide ABC transporter ATP-binding protein	5,81	4,96	5,87
CVV65_06230	transcriptional regulator	4,31	4,93	3,74
CVV65_13990	Zn-dependent hydrolase	4,85	4,88	5,86
CVV65_05390	DNA sulfur modification protein DndD	7,82	4,61	4,59
CVV65_00640	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpC	4,06	4,59	4,18
CVV65_14005	ABC transporter permease	4,06	4,59	4,35
CVV65_11545	hypothetical protein	3,59	4,55	3,56
CVV65_02720	hypothetical protein	4,92	4,54	3,63
CVV65_16300	hypothetical protein	3,33	4,52	3,31
CVV65_00325	Veg protein	6,96	4,48	4,18
CVV65_00615	peptide ABC transporter ATP-binding protein	3,83	4,46	3,2
CVV65_06500	heavy metal transport/detoxification protein	5,75	4,44	3,53
CVV65_09505	cytosine permease	3,6	4,41	3,42
CVV65_03490	multidrug transporter	4,25	4,39	5,03
CVV65_02380	urease accessory protein UreG	4,52	4,38	5,02
CVV65_06495	transcriptional regulator	5,35	4,37	3,54
CVV65_07440	cold-shock protein	7,29	4,36	4,32
CVV65_11480	branched-chain-amino-acid transaminase	4	4,34	4,35
CVV65_06090	hypothetical protein	4,92	4,29	3,99
CVV65_07555	hypothetical protein	6,27	4,29	3,96
CVV65_06385	hypothetical protein	4,46	4,26	4,08
CVV65_00825	50S ribosomal protein L29	3,9	4,25	4,02
CVV65_05700	hypothetical protein	3,39	4,17	3,41
CVV65_05495	hypothetical protein	6,88	4,16	3,21
CVV65_03505	hypothetical protein	5,1	4,11	3,91
CVV65_15675	hemolysin D	3,55	4,11	4,29
CVV65_11475	acetolactate synthase, large subunit, biosynthetic type	3,63	4,09	3,86

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Name	NCBI ID	B vs. Ref	C vs. Ref	K vs. Ref
CVV65_09510	DUF917 domain-containing protein	3,66	4,02	3,63
CVV65_01755	glycosyltransferase family 2 protein	4,73	3,98	3,35
CVV65_08000	hypothetical protein	4,25	3,94	3,81
CVV65_05480	hypothetical protein	5,69	3,93	3,51
CVV65_15865	hypothetical protein	4,4	3,92	4,2
CVV65_13575	hypothetical protein	5,47	3,88	3,9
CVV65_01370	phosphoribosylaminoimidazolesuccino- carboxamide synthase	3,16	3,86	3,27
CVV65_06390	CidB/LrgB family autolysis modulator	4,06	3,85	4,02
CVV65_12780	hypothetical protein	3,31	3,84	3,17
CVV65_01305	agmatinase	4,06	3,79	4,48
CVV65_03105	cytoplasmic protein	5,02	3,79	4,39
CVV65_06225	hypothetical protein	4,44	3,74	3,91
CVV65_02375	urease accessory protein UreF	3,33	3,72	3,78
CVV65_14975	hypothetical protein	5,06	3,71	3,28
CVV65_02330	hypothetical protein	3,13	3,66	3,24
CVV65_05385	DNA phosphorothioation system sulfurtransferase DndC	5,5	3,62	3,23
CVV65_09180	acyl carrier protein	6,33	3,62	4,56
CVV65_11795	DUF3905 domain-containing protein	5,54	3,51	3,38
CVV65_12790	ectoine/hydroxyectoine ABC transporter ATP-binding protein EhuA	3,26	3,49	3,08
CVV65_01745	glucose-1-phosphate thymidyltransferase	3,94	3,47	3,19
CVV65_02265	IS110 family transposase	3,66	3,45	3,78
CVV65_07990	pantoate-beta-alanine ligase	3,42	3,44	3,43
CVV65_10600	hypothetical protein	3,34	3,43	3,03
CVV65_14650	hypothetical protein	4,16	3,41	3,12
CVV65_04540	hypothetical protein	3,87	3,4	3,34
CVV65_15465	prepilin peptidase	3,16	3,39	3,14
CVV65_10010	30S ribosomal protein S20	5,6	3,38	3,13
CVV65_07995	aspartate 1-decarboxylase	3,26	3,28	3,5
CVV65_09250	50S ribosomal protein L28	4,59	3,26	3,01
CVV65_00835	50S ribosomal protein L14	3,27	3,25	3,48
CVV65_00795	50S ribosomal protein L23	3,18	3,18	3,25
CVV65_01190	cytochrome P450	5,27	3,11	3,57

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Name	NCBI ID	B vs. Ref	C vs. Ref	K vs. Ref
CVV65_01560	IclR family transcriptional regulator	4,48	3,08	3,24
CVV65_02600	hypothetical protein	3,03	3,04	3,02
CVV65_06670	cytochrome-c3 hydrogenase	-3,2	-3,03	-3,46
CVV65_04110	cobalt ECF transporter T component CbiQ	-3,25	-3,06	-3,7
CVV65_05325	phosphoenolpyruvate synthase regulatory protein	-3,08	-3,09	-3,21
CVV65_08075	molybdate ABC transporter permease subunit	-4,26	-3,24	-3,67
CVV65_04105	energy-coupling factor ABC transporter substrate-binding protein	-3,32	-3,27	-4,69
CVV65_08070	molybdate ABC transporter substrate-binding protein	-3,56	-3,32	-3,08
CVV65_09725	alpha-ketoacid dehydrogenase subunit beta	-3,44	-3,35	-3,19
CVV65_04085	ABC transporter permease	-3,27	-3,38	-3,04
CVV65_05215	bifunctional o-acetylhomoserine/o-acetylserine sulfhydrylase	-3,64	-3,43	-3,69
CVV65_06665	hydrogenase	-3,84	-3,51	-4,11
CVV65_08525	pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) E1 component subunit alpha	-3,35	-3,53	-3,56
CVV65_05355	hypothetical protein	-3,44	-3,54	-3,86
CVV65_05320	transcriptional regulator	-3,17	-3,6	-3,02
CVV65_03695	cytochrome c oxidase subunit I	-3,31	-3,72	-3,48
CVV65_08520	alpha-ketoacid dehydrogenase subunit beta	-3,82	-3,79	-4,2
CVV65_03710	hypothetical protein	-3,53	-3,87	-3,82
CVV65_12325	cysteine methyltransferase	-3,66	-3,94	-3,18
CVV65_13545	hypothetical protein	3,94	-4,01	-4,41
CVV65_10870	beta-ketoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase family protein	-3,72	-4,1	-3,82
CVV65_11110	malate synthase A	-3,03	-4,28	-3,48
CVV65_13155	xanthine dehydrogenase	-3,88	-4,32	-3,76
CVV65_01500	amino acid permease	-4,7	-4,39	-3,7
CVV65_08255	hypothetical protein	-4,14	-4,61	-6,99
CVV65_14700	flagellar assembly protein FliW	-4,1	-4,67	-3,24

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Name	NCBI ID	B vs. Ref	C vs. Ref	K vs. Ref
CVV65_09905	betaine-aldehyde dehydrogenase	-4,68	-4,68	-3,98
CVV65_13160	hypothetical protein	-4,74	-4,69	-4,92
CVV65_02875	acetate-CoA ligase	-4,38	-4,73	-4,33
CVV65_09730	2-oxoisovalerate dehydrogenase	-4,45	-4,73	-3,39
CVV65_13705	TetR/AcrR family transcriptional regulator	-4,28	-4,75	-3,83
CVV65_04100	cobalamin biosynthesis protein CbiM	-4,35	-4,8	-5,48
CVV65_14455	carbonate dehydratase	-4,84	-4,93	-6,21
CVV65_09920	EthD family reductase	-3,4	-4,99	-3,43
CVV65_13165	ATPase	-3,83	-5,04	-5,91
CVV65_09890	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	-3,45	-5,13	-4,2
CVV65_15450	type II secretion system protein GspE	-5,27	-5,21	-4,77
CVV65_09910	hypothetical protein	-4,57	-5,25	-4,32
CVV65_09735	leucine dehydrogenase	-5,84	-5,43	-5,37
CVV65_10875	methylmalonyl-CoA mutase	-4,53	-5,44	-4,99
CVV65_09885	acyl-CoA dehydrogenase	-3,4	-5,45	-3,29
CVV65_07065	carboxylase	-4	-5,47	-3,93
CVV65_07070	hypothetical protein	-3,65	-5,5	-3,36
CVV65_07060	hydroxymethylglutaryl-CoA lyase	-4,04	-5,64	-4,28
CVV65_00985	phosphoadenylyl-sulfate reductase	-5,2	-6,36	-6,38
CVV65_09895	3-oxoadipyl-CoA thiolase	-4,76	-6,48	-4,9
CVV65_04605	hypothetical protein	-3,49	-6,78	-4,38
CVV65_09900	thioesterase	-4,01	-6,81	-3,32
CVV65_08550	ABC transporter substrate-binding protein	-3,33	-7,04	-4,26
CVV65_14320	hypothetical protein	-7,78	-7,34	-8,08
CVV65_03310	Pyoverdine chromophore biosynthetic protein pvcC	-3,66	-7,52	-4,35
CVV65_14970	AMP-dependent synthetase	-4,64	-7,56	-5,52
CVV65_14965	ABC transporter ATP-binding protein	-3,7	-7,74	-6,61
CVV65_08580	4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase, oxygenase component	-4,35	-8,05	-5,74
CVV65_08220	homogentisate 1,2-dioxygenase	-3,95	-8,47	-4,21
CVV65_10300	sigma-54-dependent Fis family transcriptional regulator	-3,22	-8,59	-3,4

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Name	NCBI ID	B vs. Ref	C vs. Ref	K vs. Ref
CVV65_03755	hemerythrin	-3,35	-9,01	-3,69
CVV65_16045	hypothetical protein	-5,95	-9,06	-6,31
CVV65_02820	ArsR family transcriptional regulator	-7,56	-9,23	-5,99
CVV65_08645	alcohol dehydrogenase	-5,47	-9,42	-7
CVV65_10880	TetR family transcriptional regulator	-8,56	-9,54	-8,47
CVV65_05345	acyl-CoA dehydrogenase	-6,53	-11,12	-7,96
CVV65_05885	hypothetical protein	-3,15	-11,35	-3,01
CVV65_03425	phosphotriesterase-related protein	-4,84	-11,41	-6,9
CVV65_00990	sulfite exporter TauE/SafE family protein	-7,72	-12,12	-7,64
CVV65_12990	hypothetical protein	-10,24	-12,7	-6,48
CVV65_07920	IDEAL domain protein	-7,31	-12,95	-9,04
CVV65_04340	cation acetate symporter	-3,91	-13	-4,53
CVV65_08225	fumarylacetoacetase	-3,42	-13,75	-4,29
CVV65_08540	branched-chain amino acid ABC transporter permease	-3,4	-14,52	-3,22
CVV65_14260	acylamide amidohydrolase	-5,33	-14,68	-7,19
CVV65_08245	branched-chain amino acid ABC transporter permease	-4	-15,07	-4,63
CVV65_12950	hypothetical protein	-6,29	-15,41	-5,64
CVV65_13180	carbon monoxide dehydrogenase	-8,3	-15,93	-13,56
CVV65_13175	carbon monoxide dehydrogenase	-10,14	-16,65	-10,77
CVV65_03260	peptidase S15	-3,96	-17,11	-4,26
CVV65_03265	catechol 2,3-dioxygenase	-3,78	-17,93	-4,4
CVV65_13185	carbon monoxide dehydrogenase	-11,7	-18,19	-8,46
CVV65_00995	sulfate adenyltransferase	-12,01	-18,47	-12,87
CVV65_11385	ABC transporter substrate-binding protein	-3,68	-18,74	-4,71
CVV65_03420	long-chain fatty acid-CoA ligase	-4,01	-19,21	-4,39
CVV65_13170	carbon monoxide dehydrogenase	-10,8	-19,51	-10,02
CVV65_14955	branched-chain amino acid ABC transporter permease	-4,85	-20,39	-6,05
CVV65_08250	branched-chain amino acid ABC transporter permease	-4,62	-22,74	-4,03
CVV65_10285	branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase subunit E2	-20,52	-23,7	-18,59
CVV65_01505	L-glutamate gamma-semialdehyde dehydrogenase	-17,75	-23,84	-14,18

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Name	NCBI ID	B vs. Ref	C vs. Ref	K vs. Ref
CVV65_12980	ethanolamine utilization microcompartment protein EutM	-6,09	-23,87	-12,09
CVV65_08575	3,4-dihydroxyphenylacetate 2,3-dioxygenase	-5,27	-24,29	-5,4
CVV65_13925	carbon monoxide dehydrogenase	-6,06	-24,85	-5,97
CVV65_01510	proline dehydrogenase	-21,05	-26,61	-18,94
CVV65_13920	carbon monoxide dehydrogenase	-7,08	-26,87	-6,68
CVV65_14945	hypothetical protein	-7,49	-28,04	-9,74
CVV65_08230	hypothetical protein	-3,25	-29,28	-4,12
CVV65_13005	ethanolamine ammonia lyase large subunit	-7,8	-29,64	-8,11
CVV65_10425	hypothetical protein	-5,7	-30,83	-8,08
CVV65_12955	malate dehydrogenase	-4,86	-32,82	-5,43
CVV65_13930	carbon-monoxide dehydrogenase large subunit	-6,45	-35,02	-5,5
CVV65_14960	ABC transporter ATP-binding protein	-6,07	-37,58	-8,29
CVV65_12995	microcompartment protein EutL	-8,44	-45,25	-8,68
CVV65_13000	ethanolamine ammonia-lyase	-9,21	-46,2	-7,79
CVV65_12975	hypothetical protein	-12,26	-63,85	-12,62
CVV65_13010	ethanolamine utilization protein	-6,42	-70,92	-6,23
CVV65_12985	acetaldehyde dehydrogenase (acetylating)	-7,5	-71,03	-10,33
CVV65_12960	amino acid transporter	-6,88	-94,95	-6,53
CVV65_10290	alpha-ketoacid dehydrogenase subunit beta	-47,65	-122,3	-44,68
CVV65_12335	AMP-dependent synthetase	-10,32	-131	-11,91
CVV65_12340	acetone carboxylase subunit gamma	-36,95	-142,73	-72,92
CVV65_14950	hypothetical protein	-7,27	-158,35	-7,23
CVV65_12345	acetone carboxylase subunit alpha	-81,66	-192,74	-76,46
CVV65_12350	acetone carboxylase subunit beta	-82,61	-195,51	-99,91
CVV65_12970	ethanolamine utilization protein EutN	-4,34	-206,49	-8,69
CVV65_12965	ethanolamine utilization protein EutM	-3,8	-279,97	-4,04
CVV65_10295	pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) E1 component subunit alpha	-43,27	-369,86	-45,24
CVV65_13630	hypothetical protein	-9,38	-703,25	-774,39
CVV65_14940	carnitine dehydratase	-8,38	-105,25	-9,52

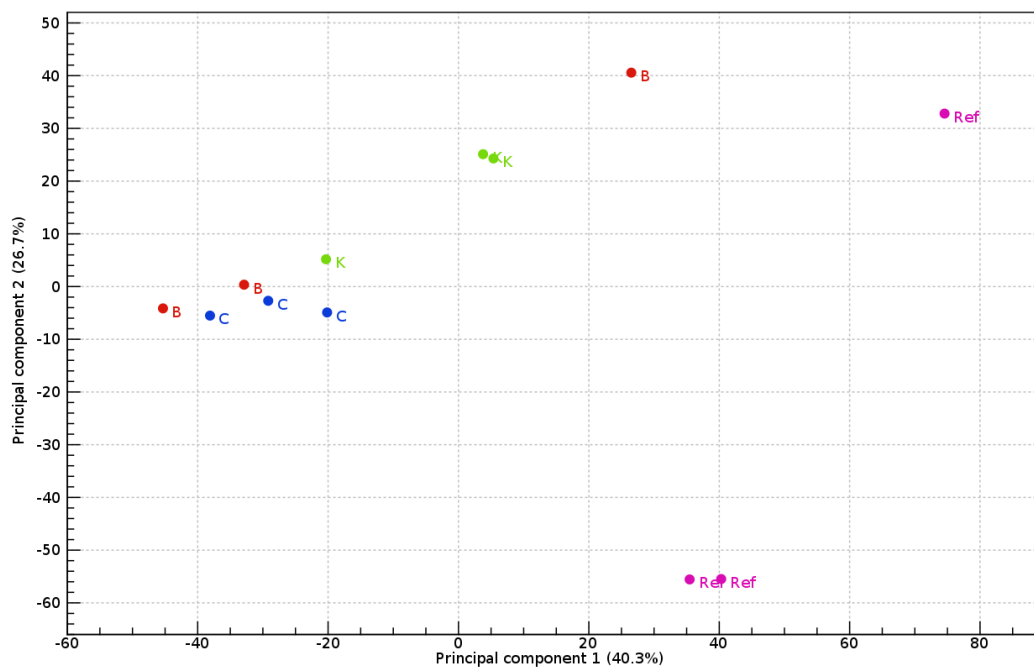


Abbildung A2: Hauptkomponentenanalyse der Transkriptomanalyse. Die Hauptkomponenten 1 und 2 decken 67% der Varianzen in den Datensätzen ab. Gezeigt sind die Triplikate der Transkriptomanalyse der Zellkulturen, die mit dem mit Aldehyd B, C oder K funktionalisierten Polymer versetzt wurden, sowie der unbehandelten Referenzkultur.