

Optimierung und Lokalisation elektroaktiver Biofilme mittels magnetischer Nanopartikel

Vom Promotionsausschuss der
Technischen Universität Hamburg

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation (Monographie)

von

René Wurst

aus

Riedlingen

2026

Gutachter: Prof. Dr. Johannes Gescher
Prof. Dr. Anna-Lena Heins

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Michael Schlüter

Tag der mündlichen Prüfung: 21.11.2025

DOI: <https://doi.org/10.15480/882.17247>

Handle: <https://hdl.handle.net/11420/63326>

 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6174-7613>

Dieser Text steht, soweit nicht anders gekennzeichnet, unter der Creative-Commons-Lizenz Namensnennung 4.0 (CC BY 4.0). Das bedeutet, dass er vervielfältigt, verbreitet und öffentlich zugänglich gemacht werden darf, auch kommerziell, sofern dabei stets der Urheber, die Quelle des Textes und o. g. Lizenz genannt werden. Die genaue Formulierung der Lizenz kann unter <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.de> aufgerufen werden.

Zusammenfassung

In bioelektrochemischen Systemen (BES) sind Biofilmbildung und -architektur von entscheidender Bedeutung, insbesondere für Durchflussanwendungen. Die Grenzfläche zwischen elektroaktiven Mikroorganismen und der Elektrodenoberfläche spielt eine wichtige und oft begrenzende Rolle, da die verfügbare Oberfläche die Stromerzeugung beeinflusst, insbesondere bei Organismen, die nur schwache anodische Biofilmbildner sind. Um die Begrenzung der verfügbaren Elektrodenoberfläche zu überwinden, wurden Nanopartikel (NPs) mit einem magnetischen Eisenkern und einer leitfähigen, hydrophoben Kohlenstoffhülle als Bausteine verwendet. Damit sollten leitfähige, magnetische Mikrosäulen auf der Anodenoberfläche gebildet werden. Die Bildung dieser dynamischen dreidimensionalen Elektrodenarchitektur wurde *in situ* mittels optischer Kohärenztomographie (OCT) überwacht und quantifiziert. Durch Cyclovoltammetrie wurde festgestellt, dass die aufgebauten dreidimensionalen Anodenerweiterungen elektrisch leitfähig sind und die verfügbare elektroaktive Oberfläche vergrößern. Die NPs wurden als kontrollierbare Träger für die elektroaktiven Modellorganismen *Shewanella oneidensis* und *Geobacter sulfurreducens* verwendet, was zu einer 5-fachen Erhöhung der stationären Stromdichte für *S. oneidensis* führte, die in Kombination mit Poly(3,4-ethyldioxythiophen)-Poly(styrolsulfonat)-Aggregaten (PEDOT:PSS) sogar um das 22-fache gesteigert werden konnte. Im Falle von *G. sulfurreducens* wurde die stationäre Stromdichte nicht erhöht, aber viermal schneller erreicht.

Darüber hinaus wurde die Biosynthese magnetischer FeS-NPs durch *S. oneidensis* untersucht, um hybride Biofilme mit optimierten Eigenschaften zu erzeugen. Die biogenen Partikel zeigten sowohl magnetische als auch elektroaktive Eigenschaften und ermöglichten eine verbesserte elektrische Kopplung an die Elektrode, ohne cytotoxische Effekte hervorzurufen.

Die Studie stellt eine kontrollierbare, skalierbare und einfach anzuwendende Methode zur Vergrößerung der Elektrodenoberfläche in bestehenden BES durch Anlegen eines Magnetfeldes und Zugabe leitfähiger magnetischer NPs vor. Diese Erkenntnisse lassen sich höchstwahrscheinlich auch auf andere elektroaktive Mikroorganismen übertragen.

Abstract

In bioelectrochemical systems (BES), the formation and architecture of biofilms are of crucial importance, especially in the context of flow-through applications. The interface between electroactive microorganisms and the electrode surface plays a pivotal role in determining the available surface area, which in turn influences energy generation. This is particularly relevant in organisms that form only weak anodic biofilms. To address this limitation, nanoparticles (NPs) with a magnetic iron core and a conductive, hydrophobic carbon shell were utilized as building blocks to create conductive, magnetic micropillars on the anode surface. The formation of this dynamic three-dimensional electrode architecture was monitored and quantified *in situ* using optical coherence tomography (OCT). Cyclic voltammetry revealed that the assembled three-dimensional anode extensions were electrically conductive and increased the available electroactive surface area. The NPs functioned as controllable carriers for the electroactive model organisms *Shewanella oneidensis* and *Geobacter sulfurreducens*, resulting in a fivefold increase in steady-state current density for *S. oneidensis*. This increase was further enhanced up to 22-fold when combined with poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-polystyrene sulfonate (PEDOT:PSS) aggregates. In the case of *G. sulfurreducens*, the steady-state current density was not increased but was reached four times faster.

Additionally, the biosynthesis of magnetic FeS-NPs by *S. oneidensis* was investigated to generate hybrid biofilms with optimized properties. The biogenic particles exhibited both magnetic and electroactive properties, enabling improved electrical coupling to the electrode without inducing cytotoxic effects.

This study proposes a method for expanding the electrode surface in existing BES. This method is controllable, scalable, and easily applicable. It involves applying a magnetic field and adding conductive magnetic NPs. These findings are likely transferable to other electroactive microorganisms as well.

Danksagung

Lieber Prof. Johannes Gescher, mein erster und größter Dank gebührt selbstverständlich dir. Danke, dass du mich seit unserem ersten Kennenlernen als Menschen und Wissenschaftler schätzt. Ich habe mich bei dir immer in guten Händen gefühlt, empfinde dein mir entgegengebrachtes Vertrauen als riesiges Privileg und bin dir überaus dankbar dafür, wie du mich als Quereinsteiger in deinem Institut zu einem wichtigen und tragenden Bestandteil der Arbeitsgruppe geformt hast und mir dabei dennoch den nötigen Raum zur freien Entfaltung gewährst. Du hast mir vermittelt, wissenschaftliche Fragestellungen von Anfang bis Ende zu durchdenken, diese dann auch unter realen experimentellen Bedingungen zu verfolgen und systematisch auf den Prüfstand zu stellen. Ich bewundere deinen Tatendrang, deine brillante Auffassungsgabe, deinen vorbildlichen Umgang mit akademischem Nachwuchs und deinen positiven Blick auf Herausforderungen. Ich freue mich, dass wir uns so gut verstehen, bin mir sicher, dass wir gemeinsam noch so einiges erreichen werden und weiß, dass ich noch immer sehr viel von dir lernen kann. Vielen Dank, Johannes!

Ein riesiges Dankeschön geht an Dr. Edina Klein. Du warst und bist für mich eine herausragende Mentorin und ich bin dir sehr dankbar für die unzähligen Stunden und Gehirnzellen die du mir schon gewidmet hast. Mal sehen was die Zukunft für "Team Kleine Wurst" noch so bereithält. Darüber hinaus bist du für mich zu einer super Freundin fürs Leben geworden und das macht mich sehr froh. Danke Edi!

Außerdem gilt mein Dank der gesamten Arbeitsgruppe für das phänomenale Arbeitsklima und die freundschaftliche, familiäre Atmosphäre. Danke an Sigi, Petra und Nadja! Ihr haltet und hieltet diesen manchmal etwas chaotischen Haufen zusammen und ohne euch wären wir anderen des Öfteren ziemlich verloren. Danke an

Ahmed, Benni, Beri, Carmen, Chrissi, Daniel, Henni, Janek, Jonas, Kerstin, Laura, Leonie, Lukas, Mahshid, Melanie, Miri, Nikolai, Sri, Vivi, Yitian! Ihr alle habt mich begleitet und unterstützt und einige von euch zähle ich inzwischen zu meinen besten Freund*innen. Ich dachte früher, dass ich Arbeit und Privatleben gern trennen würde; das wird aber ziemlich schwierig, wenn der halbe Freundeskreis aus Kolleg*innen besteht.

Ich danke außerdem Nils und Bernd von der Forschungswerkstatt Elektrotechnik. Ihr macht richtig tolle Arbeit und wir werden sicherlich noch so einige verrückte Dinge zusammen konstruieren. Mein Dank gilt auch Martin Ritter und der gesamten Betriebseinheit Elektronenmikroskopie für ihre kompetente und kollegiale Unterstützung.

Zudem danke ich meinen Student*innen für ihren Einsatz, den Willen Neues zu entdecken und Herausforderungen unkonventionell anzugehen. Ich hoffe, dass meine Begeisterung für die Wissenschaft auf euch ein wenig abgefärbt hat. Auch ich konnte so einiges von und mit euch lernen!

Ein ganz großes Dankeschön geht an meinen ehemaligen Lehrer, ersten wissenschaftlichen Mentor und Förderer Hermann Heinzelmann. Sie waren mir früh ein Vorbild, haben mein Potential erkannt und mir den Spaß am sauberen wissenschaftlichen Arbeiten vermittelt. Ohne Sie und "Jugend forscht" wäre mein Leben vermutlich ganz anders verlaufen.

Danke auch an meine Familie, die immer an mich glaubt und mich unterstützt, wo es nur geht, auch wenn ich inzwischen in einem ganz anderen Kosmos lebe. Mein Studium und schließlich meine Promotion waren für uns als Familie eine ganz

besondere neue Erfahrung und ich bin unendlich stolz darauf, was wir schon alles gemeinsam mit Bravour gemeistert haben und weiß, dass wir alles schaffen können, wenn wir es nur genug wollen.

Danke Mama, dass du mir immer vertraut und mich machen lassen hast. Das war bestimmt nicht immer leicht, aber ich versichere dir, dass dein Sohn schon weiß, was er tut, auch wenn das auf dich vielleicht nicht immer so wirkt. Du bist eine Lebenskünstlerin und ein Vorbild für mich und ich bewundere deinen unbändigen Antrieb, Optimismus und Pragmatismus. Vor langer Zeit habe ich dir ein Cabrio versprochen. Inzwischen habe ich gelernt, dass andere Dinge viel wichtiger sind, aber du kannst mich hier beim Wort nehmen und der Tag wird kommen, an dem ich dich mit einem offenen Verdeck überrasche.

Lieber Kai, wir waren immer füreinander da und werden es auch immer sein. Davon bin ich fest überzeugt und ich bin so froh, dass du mein Bruder bist. Ich bin mindestens so stolz auf dich, wie du auf mich, und bewundere, was du aus deinem Leben machst und mit welcher Leichtigkeit du durch eben jenes gehst!

Liebe Omi Helga, leider konntest du nicht mehr ganz miterleben, wie ich tatsächlich zum "Herrn Doktor" geworden bin. Ach, wie gerne hätte ich mit dir zusammen gefeiert. Ich bin so dankbar für deine Güte und Stärke und freue mich, dass ich das Leuchten in meinen Augen von dir geerbt habe. Du warst die allerbeste Köchin, hast mich nachhaltig geprägt und warst ein Leben lang ein Vorbild für mich! Auf dass das Leuchten in unseren Augen nie erlischt!

Matthi, auch dir möchte ich meinen Dank aussprechen. Du bist mein bester Freund, immer für mich da und wie ein Bruder für mich. Es ist unglaublich, welche Wandlungen wir gemeinsam schon durchlebt haben und wie wir dadurch nur noch engere Freunde geworden sind.

Zu guter Letzt möchte ich mir noch kurz selbst auf die Schulter klopfen. Ich bin

krass stolz auf meinen bisherigen Werdegang und sehr gespannt, was die Zukunft noch für mich bereithält. Die Abgabe der Dissertation fühlt sich wie das Ende eines sehr großen und langen Kapitels an, doch ich bin mir sicher: die Geschichte ist noch lange nicht auserzählt.

Viel Spaß und Erkenntnisgewinn beim Lesen!

Euer René

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	i
Abstract	ii
Danksagung	iii
Abbildungsverzeichnis	x
Tabellenverzeichnis	xii
Abkürzungsverzeichnis	xiii
1 Einleitung	1
1.1 Bioelektrochemische Systeme	2
1.2 Extrazellulärer Elektronentransfer	4
1.2.1 EET bei <i>Shewanella oneidensis</i>	5
1.2.2 EET bei <i>Geobacter sulfurreducens</i>	8
1.2.3 Interaktion zwischen Bakterien und Anode	10
1.3 Biofilme im BES	13
1.4 Optimierung von BES	15
1.5 Zielsetzung	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Chemikalien	19
2.2 Mikroorganismen	19
2.3 Kulturmedien und Wachstumsbedingungen	19
2.4 Wachstumskurven	25
2.5 Bradford-Assay	26

2.6	Vorbehandlung der Nanopartikel	27
2.7	Bioelektrochemische Mikrofluidikplattform	27
2.8	Elektrochemische Methoden	31
2.8.1	Chronoamperometrie	31
2.8.2	Cyclovoltammetrie	32
2.8.3	Herstellung der Referenzelektroden	35
2.9	Bildgebende Verfahren	37
2.9.1	Optische Kohärenztomographie	37
2.9.2	Fluoreszenzmikroskopie	38
2.9.3	Rasterelektronenmikroskopie	40
2.9.4	Energiedispersive Röntgenspektroskopie	41
3	Ergebnisse	44
3.1	Assemblierung einer dynamischen 3D-Elektrode	44
3.2	Disassemblierung der 3D-Elektrode	46
3.3	Elektrochemische Analyse der 3D-Elektrode	47
3.4	Viabilitätsassays elektroaktiver Zellen auf Nanopartikel-Aggregaten .	48
3.5	Magnetische Nanopartikel optimieren die BES-Performance	49
3.6	Kombination mit PEDOT:PSS-Aggregaten sorgt für weiter gesteigerte <i>S. oneidensis</i> -Performance in BES	53
3.7	Untersuchung des Einflusses von durch <i>S. oneidensis</i> biosynthetisierten FeS-NPs auf die BES-Performance	56
3.7.1	FeS- <i>Shewanella</i> -Hybride weisen magnetische Eigenschaften auf	57
3.7.2	Zellviabilitätsassay der FeS- <i>Shewanella</i> -Hybride	59
3.7.3	FeS- <i>Shewanella</i> -Hybride verbessern BES-Performance	60
4	Diskussion	63

4.1	Vergrößerung der elektroaktiven Elektrodenoberfläche mittels leitfähiger, magnetischer Nanopartikel	63
4.2	Magnetische Nanopartikel-Aggregate fungieren als steuerbares Trägermaterial für Mikroorganismen	64
4.3	Mikrostrukturierte 3D-Elektrode optimiert elektroaktive Biofilme . .	65
4.4	FeS- <i>Shewanella</i> -Hybride zeigen magnetische und elektroaktive Eigenschaften	71
4.5	FeS-NPs zeigen keine Cytotoxizität	73
4.6	FeS- <i>Shewanella</i> -Hybride verbessern die Performance im BES	74
5	Fazit und Ausblick	77
	Literaturverzeichnis	xiv
	Anhang	xxxiii

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematischer Aufbau eines bioelektrochemischen Systems. . . .	2
Abb. 2	Schematischer Mechanismus des extrazellulären Elektronentransfers von <i>S. oneidensis</i>	6
Abb. 3	Schematischer Mechanismus des extrazellulären Elektronentransfers von <i>G. sulfurreducens</i>	9
Abb. 4	Mechanismen des Elektronentransfers von exoelektrogenen Bakterien auf eine Anode.	11
Abb. 5	Bioelektrochemische Mikrofluidikplattform zur Kultivierung und Analyse elektroaktiver Biofilme und anodischer Mikrostrukturen.	28
Abb. 6	Schematische Darstellung des Vorgehens zur cyclovoltammetrischen Analyse der magnetischen FeS- <i>Shewanella</i> -Hybride.	34
Abb. 7	Aufbau der Apparatur zur simultanen Herstellung von 16 Referenzelektroden.	36
Abb. 8	Mögliche Wechselwirkung von Elektronen mit Materie.	41
Abb. 9	Schematische Darstellung der Entstehung von charakteristischer Röntgenstrahlung.	42
Abb. 10	Höhenprofil und schematische Darstellung der leitfähigen, magnetischen Mikrosäulen auf der Anodenoberfläche und die zugehörigen Nanopartikel Bausteine.	45
Abb. 11	Elektrochemische Analyse der anodischen Oberflächenerweiterung.	48
Abb. 12	Viabilitätsassays von <i>G. sulfurreducens</i> und <i>S. oneidensis</i> auf magnetischen, leitfähigen Nanopartikel-Aggregaten.	49
Abb. 13	Vergleich der Stromdichten mit und ohne Zugabe magnetischer, leitfähiger NPs für <i>S. oneidensis</i> und <i>G. sulfurreducens</i>	50

Abb. 14	REM-Aufnahme eines mikrostrukturierten anodischen <i>G. sulfurreducens</i> -Biofilms.	53
Abb. 15	Kombination der magnetischen, leitfähigen NPs mit PEDOT:PSS-Aggregaten sorgt für weiter gesteigerte <i>S. oneidensis</i> -Performance in BES.	55
Abb. 16	Höhenprofile der mit einem schwächeren und stärkeren Magneten auf der Anodenoberfläche assemblierten FeS-NPs.	57
Abb. 17	Elektrochemische Analyse der FeS- <i>Shewanella</i> -Hybride.	59
Abb. 18	Viabilitätsassays der FeS- <i>Shewanella</i> -Hybride.	60
Abb. 19	Vergleich der Stromdichten der FeS- <i>Shewanella</i> -Hybride mit und ohne Einsatz eines Magneten.	62
Abb. 20	Schematische Darstellung zum Vergleich des Elektronentransfers über lange Distanzen bei Kabelbakterien und bei <i>S. oneidensis</i> mittels leitfähiger nanostrukturierter Mikrosäulen.	69
Abb. 21	Schematische Darstellung des klassischen EET bei <i>S. oneidensis</i> und der vorgeschlagene EET der FeS- <i>Shewanella</i> -Hybride.	75

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Liste der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.	19
Tab. 2	Zusammensetzung der LB-Medien zur Anzucht von <i>S. oneidensis</i>	20
Tab. 3	Zusammensetzung der Selenit-Wolframat-Lösung (1000X).	20
Tab. 4	Zusammensetzung der Spurenelementlösung (100X).	21
Tab. 5	Zusammensetzung der Vitaminlösung (1000X).	21
Tab. 6	Zusammensetzung der Salzlösung (10X).	21
Tab. 7	Zusammensetzung des Mediums zur anoxischen Kultivierung von <i>S. oneidensis</i>	22
Tab. 8	Zusammensetzung des Mediums zur anoxischen Kultivierung von <i>G. sulfurreducens</i>	22
Tab. 9	Zusammensetzung des Mediums zur anodischen Kultivierung von <i>S. oneidensis</i>	23
Tab. 10	Zusammensetzung des Mediums zur anodischen Kultivierung von <i>G. sulfurreducens</i>	24
Tab. 11	Zusammensetzung des Mediums zur biogenen Synthese magneti- scher FeS-Nanopartikel durch <i>S. oneidensis</i>	25
Tab. 12	Zusammensetzung der Bradford-Lösung.	26
Tab. 13	Zusammensetzung der Elektrolytlösung.	32
Tab. 14	Zusammensetzung der phosphatgepufferten Salzlösung (PBS, 10X).	38

Abkürzungsverzeichnis

APS	<i>Average particle size</i> , durchschnittliche Partikelgröße
BES	Bioelektrochemisches System
BSA	Bovines Serumalbumin
CV	Cyclovoltammetrie
EDX	Energiedispersive Röntgenspektroskopie
EET	Extrazellulärer Elektronentransfer
EPS	Extrazelluläre polymere Substanzen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
NPs	Nanopartikel
OCT	<i>Optical coherence tomography</i> , Optische Kohärenztomographie
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PEDOT:PSS	Poly-3,4-ethylendioxythiophen:Poly(styrolsulfonsäure)
PDMS	Polydimethylsiloxan
REM	Rasterelektronenmikroskopie
rpm	<i>Rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
SHE	<i>Standard hydrogen electrode</i> , Standardwasserstoffelektrode

1 Einleitung

Der jährliche Gesamtstromverbrauch der rund 10.000 in Deutschland betriebenen kommunalen Kläranlagen beträgt im Jahr etwa 3,4 TWh, was dem Elektrizitätsbedarf von ungefähr einer Million Vier-Personen-Haushalten entspricht und mit CO₂-Emissionen von rund 1,3 Millionen Tonnen verbunden ist. Zusätzlich emittieren diese Anlagen größere Mengen weiterer Treibhausgase wie Lachgas und Methan (Fricke, 2009; Niederste-Hollenberg *et al.*, 2021). Auf globaler Ebene ist die Datenlage weniger aussagekräftig, es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass etwa 3 % des weltweiten Gesamtenergieverbrauchs und etwa 5 % der Treibhausgasemissionen auf Abwasserbehandlung entfallen (Magni *et al.*, 2025; Maktabifard *et al.*, 2023). Trotz der umfangreichen Umwandlung von Biomasse weisen Kläranlagen also eine geringe Energieeffizienz auf. Die Bereitstellung von sauberem Trinkwasser ist zweifellos von hoher gesellschaftlicher und ökologischer Relevanz, sodass Einsparungen an dessen Qualität nicht in Betracht gezogen werden dürfen. Dennoch bestehen erhebliche Optimierungsmöglichkeiten zur ökonomischeren und ökologischeren Gestaltung der Abwasseraufbereitung.

Ein vielversprechender Ansatz beruht auf dem Einsatz von Bakterien, die unter anaeroben Bedingungen organische Substanzen abbauen und dabei elektrische Energie generieren können, sogenannte exoelektrogene Mikroorganismen. Trotz des erheblichen technologischen Fortschritts auf diesem Gebiet, besteht hinsichtlich der Effizienz weiterhin ein großes Optimierungspotenzial bei der mikrobiellen Stromproduktion. Die Weiterentwicklung dieser Technologie könnte einen wesentlichen Beitrag dazu leisten, Kläranlagen in Zukunft energieautark oder sogar energieproduzierend zu betreiben (Yan *et al.*, 2020).

1.1 Bioelektrochemische Systeme

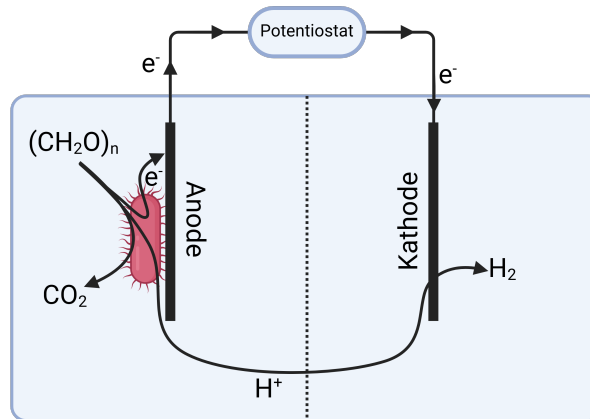


Abb. 1: **Schematischer Aufbau eines bioelektrochemischen Systems.** An der Anode wird organisches Substrat durch exoelektrogene Mikroorganismen oxidiert. Die freiwerdenden Elektronen fließen über eine elektrische Leitung zur Kathode, während die Protonen durch den Elektrolyten zur Kathode diffundieren. An der Kathode wird aus Elektronen und Protonen Wasserstoff bzw. in Anwesenheit von Sauerstoff Wasser gebildet.

Zur Gewinnung elektrischer Energie mittels exoelektrogener Mikroorganismen werden bioelektrochemische Systeme (BES) eingesetzt. Aufbau und Funktionsweise dieser Systeme sind im Wesentlichen vergleichbar mit Brennstoff- bzw. Elektrolysezellen. In einer herkömmlichen Brennstoffzelle wird die chemische Energie eines kontinuierlich zugegebenen Brennstoffs (meist Wasserstoff, jedoch auch Ammoniak, Alkohole, Aldehyde, oder andere Kohlenwasserstoffe) durch räumlich getrennte Redoxreaktion mit einem Oxidationsmittel (meist Luftsauerstoff) in elektrische Energie umgewandelt (Qasem und Abdulrahman, 2024). Gängige Katalysatoren hierfür sind die Edelmetalle Platin und Palladium. Die räumliche Trennung von Oxidations- und Reduktionsreaktion wird beispielsweise durch einen Elektrolyten oder eine Ionenaustauschmembran gewährleistet. Im BES katalysieren hingegen Mikroorganismen die Oxidation organischer Substrate zu CO_2 , Protonen und Elektronen an einer Anode, welche beispielsweise aus kostengünstigem Graphit bestehen kann und ohne kostspielige Edelmetalle auskommt. Respiratorisch freiwerdende Elektronen fließen

aufgrund des Potentialunterschieds zwischen Oxidations- und Reduktionsreaktion über einen Stromkreis zur Kathode, während die Protonen an den Elektrolyten abgegeben werden (Abbildung 1; Logan und Regan, 2006; Logan *et al.*, 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde eine sogenannte mikrobielle Elektrolysezelle verwendet. Hierbei kann über einen Potentiostaten das Potential an der Arbeitselektrode (hier Anode) eingestellt werden.

Die erste Publikation zur mikrobiell katalysierten Konversion chemischer in elektrische Energie datiert bereits mehr als 100 Jahre zurück (Potter, 1911). Aufgrund verhältnismäßig geringer Energiedichten dieser Systeme sowie der Konzentration menschlicher Bemühungen auf die Entwicklung fossiler und atomarer Energieträger im 20. Jahrhundert, stagnierte die Forschung und vor allem die industrielle Anwendung auf diesem Gebiet allerdings für längere Zeit. Das aufkommende Bewusstsein zum Klimawandel und die daraus resultierende Notwendigkeit zur zügigen Treibhausgasneutralität und Elektrifizierung der Wirtschaft, haben das Interesse und die Ambitionen im Feld der BES um die Jahrhundertwende jedoch neu entfacht (Schröder, 2011).

Darüber hinaus erwähnenswert ist die verhältnismäßig junge Entdeckung, dass in BES nicht nur chemische Energie in elektrische umgewandelt werden kann. Es erlaubt außerdem bisher nicht zugängliche Fermentationen mit stöchiometrisch unausgeglichene Redoxbilanzen, sogenannte Elektrofermentationen (Schievano *et al.*, 2016; Moscoviz *et al.*, 2016). Des Weiteren ist in BES auch der zum oben beschriebenen gegenläufige Prozess möglich, bei dem also eine Konversion elektrischer Energie in chemische stattfindet und die Mikroorganismen an der Kathode des Systems lokalisiert sind (Rabaey und Rozendal, 2010). Dies wird als mikrobielle Elektrosynthese bezeichnet und gewährleistet einen Elektronenfluss von der Arbeitselektrode auf die betreffenden Mikroorganismen, was beispielsweise die Reduktion von CO_2 als Rohstoff zur Herstellung verschiedener organischer Chemikalien, wie Polyhydroxybutyrat

(PHB), Ameisensäure oder Isobutanol ermöglicht (Rominger *et al.*, 2024; Jeon *et al.*, 2015; Cava *et al.*, 2020; Le *et al.*, 2018).

Potentielle Anwendungen bioelektrochemischer Systeme sind neben der Produktion von elektrischem Strom und Wasserstoff sowie biosynthetischer Produkte unter anderem denkbar im Feld der Biosensorik zum Umweltmonitoring und zur Detektion toxischer Chemikalien im Abwasser oder an entlegenen Orten (Golitsch *et al.*, 2013; Webster *et al.*, 2014; Su *et al.*, 2011).

In dieser Arbeit lag der Fokus auf der Optimierung und Lokalisation anodischer Biofilme, was jedoch nicht ausschließt, dass die gewonnenen Erkenntnisse auch beispielsweise auf kathodische Systeme zur Elektrosynthese übertragbar sind.

1.2 Extrazellulärer Elektronentransfer

Voraussetzung zur Anwendung im BES ist die Fähigkeit der eingesetzten Mikroorganismen zum sogenannten extrazellulären Elektronentransfer (EET). Dies bedeutet, dass Elektronen aus der Atmungskette an die Zelloberfläche transportiert und damit extrazelluläre Akzeptoren reduziert werden können. Vertreter mit dieser Eigenschaft werden auch als exoelektrogen bezeichnet. Wie oben erwähnt (Abschnitt 1.1), kann in einer bioelektrochemischen Anordnung eine Anode als terminaler Elektronenakzeptor fungieren. In der Natur hingegen sind Metalle oder Metallkationen in Form von Erzen gängige Akzeptoren solcher Organismen. Dies ermöglicht Exoelektrogenen das Wachstum in ökologisch ansonsten schwer zugänglichen Nischen, in welchen ein Mangel an Sauerstoff als typischem Elektronenakzeptor vorherrscht (Logan, 2009; Lovley, 2006).

Zu den am intensivsten untersuchten exoelektrogenen Modellorganismen zählen unter

anderem die Gram-negativen Proteobakterien *Shewanella oneidensis* und *Geobacter sulfurreducens*. Sie sind Gegenstand aktueller Forschung zur zellulären Atmung und wurden auch in dieser Arbeit als Modellorganismen gewählt. Im Folgenden wird auf die beiden Organismen mit Fokus auf die molekularen Mechanismen des EET sowie Unterschiede und Gemeinsamkeiten bei Anodeninteraktion und Biofilmbildung genauer eingegangen.

1.2.1 EET bei *Shewanella oneidensis*

Im Jahr 1988 erfolgte die erstmalige Isolierung von *S. oneidensis* aus dem Sediment des Lake Oneida in den USA, wobei seine Mangan-reduzierende Eigenschaft beobachtet wurde (Myers und Nealson, 1988). Das Bakterium zeigt ein Wachstum unter anaeroben und aeroben Bedingungen bei idealerweise 30 °C (Venkateswaran *et al.*, 1999). Als Elektronendonator nutzt *S. oneidensis* unter anderem Laktat, Formiat oder N-Acetylglucosamin, während ein breites Substratspektrum an Akzeptoren zur Verfügung steht. Hierzu zählen bei Sauerstoffmangel unter anderem lösliche Verbindungen wie Dimethylsulfoxid, Fumarat und Nitrat sowie unlösliche Eisen(III)-, Uran(IV)- und Mangan(III/IV)-oxide (Heidelberg *et al.*, 2002; Bretschger *et al.*, 2007). Darüber hinaus ist das Bakterium unter anaeroben Bedingungen dazu in der Lage, Elektronen an die Anode eines bioelektrochemischen Systems abzugeben (Kim *et al.*, 1999).

Der Elektronentransport erfolgt vom Cytoplasma über das Periplasma bis hin zur Zelloberfläche, wobei *c*-Typ-Cytochrome eine zentrale Rolle spielen (Fonseca *et al.*, 2013). Cytochrome sind Proteine, die Häm-Gruppen als Cofaktoren tragen. Das zentrale Eisenatom im Häm-Komplex kann durch Aufnahme und Abgabe eines Elektrons seine Oxidationsstufe ändern. Dementsprechend sind Cytochrome essentielle

Bestandteile von Elektronentransportketten. Je nach Licht-Absorptionsspektrum unterscheidet man zwischen Cytochromen vom Typ *a*, *b*, *c* und *d*. Das Genom von *S. oneidensis* enthält 42 Gene für *c*-Typ-Cytochrome (Meyer *et al.*, 2004).

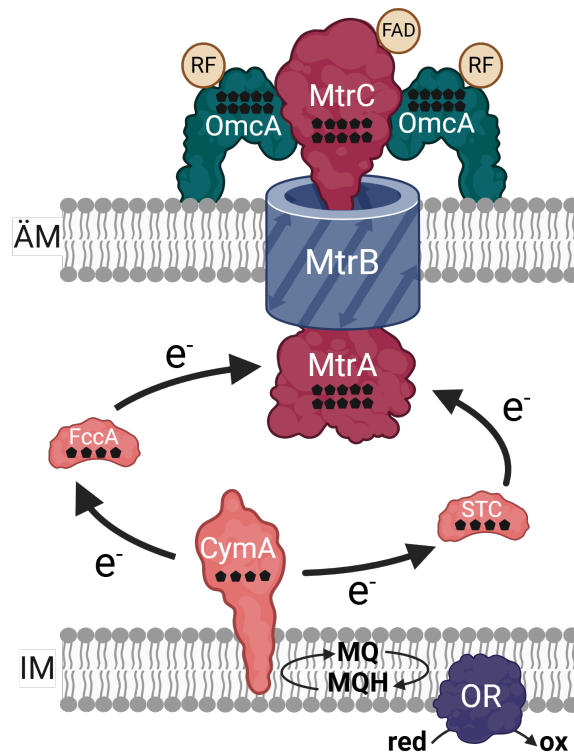


Abb. 2: **Schematischer Mechanismus des extrazellulären Elektronentransfers von *S. oneidensis*.** CymA überträgt Elektronen aus dem Menachinon-Pool (MQ/MQH) auf periplasmatische Proteine wie FccA und STC. Diese transportieren die Elektronen weiter auf MtrA, von wo sie durch den, in der äußeren Membran (ÄM) befindlichen, MtrABC-Komplex an MtrC weitergegeben werden. OmcA und MtrC markieren das Ende der Elektronentransportkette und geben die Elektronen schließlich an extrazelluläre Akzeptoren ab. Die schwarzen Pentagone symbolisieren jeweils die Anzahl der Häm-Gruppen in den Cytochromen. IM steht für innere Membran, FAD für Flavin-Adenin-Dinukleotid, RF für Riboflavin und OR für Oxidoreduktase. Modifizierte Reproduktion nach Klein *et al.* (2023).

Die Elektronentransportkette (Abbildung 2) beginnt mit einer Oxidoreduktase, die in der Cytoplasmamembran verankert ist und Elektronen auf den Menachinon-Pool überträgt. Von dort aus gelangen die Elektronen zum, an der Cytoplasmamembran lokalisierten, *c*-Typ-Cytochrom CymA (*Cytoplasmic membrane protein A*), das als Verteiler fungiert und Elektronen an verschiedene periplasmatische

c-Typ-Cytochrome weitergibt (Marritt *et al.*, 2012). Hier spielen insbesondere FccA (Fumarat-Reduktase) und STC (*Small tetraheme cytochrome*) eine wesentliche Rolle, da Deletionsdoppelmutanten ohne diese Proteine nicht mehr zur Elektronenübertragung auf terminale Reduktasen der äußeren Membran befähigt sind (Sturm *et al.*, 2015). Die periplasmatischen Cytochrome FccA und STC übertragen die Elektronen auf MtrA (*Metal reducing protein A*), welches zusammen mit MtrB (*Metal reducing protein B*) und MtrC (*Metal reducing protein C*) einen Proteinkomplex bildet, der die äußere Membran durchspannt. MtrB bildet eine Pore, die die räumliche Nähe zwischen MtrA und MtrC sicherstellt. Die Elektronen werden schließlich von MtrC auf extrazelluläre Elektronenakzeptoren übertragen (Coursole *et al.*, 2010). Neben MtrC spielt auch OmcA (*Outer membrane cytochrome A*) eine Rolle bei der Reduktion extrazellulärer Akzeptoren (Bücking *et al.*, 2010). MtrC und OmcA enthalten zusätzlich Flavin-Cofaktoren, die den terminalen Elektronentransfer durch die Bildung von Semichinonen erleichtern (Okamoto *et al.*, 2013; Okamoto *et al.*, 2014a; Okamoto *et al.*, 2014b; Xu *et al.*, 2016).

Darüber hinaus können von *S. oneidensis* sekretierte Flavine insbesondere unter Batch-Bedingungen als Elektronenshuttle fungieren, was den Elektronentransfer zu unlöslichen Elektronenakzeptoren oder zu einer Anode erleichtert, falls kein direkter Kontakt besteht (vergleiche Abschnitt 1.2.3). Flavine sind unter Batch-Bedingungen für etwa 75 % des extrazellulären Elektronentransports zu unlöslichen Akzeptoren verantwortlich (Kotloski und Gralnick, 2013). Unter kontinuierlichen Flussbedingungen spielen Flavine als Shuttle-Moleküle vermutlich eine eher untergeordnete Rolle, da sie ausgespült werden und ihre Biosynthese eine hohe metabolische Belastung bedeutet (Engel *et al.*, 2019).

Shewanella's Fähigkeit zum EET auf ein breites Substratspektrum ermöglicht, über die Anwendung im BES hinaus, weitere Anwendungen. So kann unter anderem

eine Reihe von Nanomaterialien durch Reduktion biosynthetisiert werden. Hierzu zählen beispielsweise Edelmetall-Nanopartikel (NPs) aus Pd, Ag, Cu, Au oder Pt (Schkolnik *et al.*, 2015; Maes *et al.*, 2017; Kimber *et al.*, 2018; Law *et al.*, 2022; Wu *et al.*, 2013), welche hervorragende katalytische Eigenschaften aufweisen und deren Nachfrage konstant steigt. Die Biosynthese solcher NPs benötigt hierbei weniger toxische und kostenintensive Reagenzien zur Reduktion und Stabilisierung, bietet also eine konkurrenzfähige Alternative zur konventionellen chemischen Synthese (Corte *et al.*, 2012; Hennebel *et al.*, 2009; Ali *et al.*, 2019). Weitere Nanomaterialien, welche mit Hilfe von *S. oneidensis* synthetisiert werden können, sind unter anderem Graphen, nanostrukturierte Selen-Spezies und bio-FeS-NPs (Lehner *et al.*, 2019; Pearce *et al.*, 2009; Fu *et al.*, 2021; Dang *et al.*, 2021). Letztere weisen beispielsweise vielversprechende Eigenschaften zur Bioremediation auf. Fu *et al.* (2021) erzeugten hierzu einen Hybrid aus *S. oneidensis* und bio-synthetisierten FeS-NPs, welche nicht nur die Zelloberfläche bedeckten, sondern artifizielle Elektronentransportkanäle durch die innere und äußere Membran der Zelle bildeten. Dadurch konnte die Kinetik beim Umsatz von toxischem Cr(VI) in Cr(III) verbessert werden. Eine Anwendung zur Optimierung im BES könnte durch den verbesserten Elektronentransport jedoch auch durchaus vielversprechend sein.

1.2.2 EET bei *Geobacter sulfurreducens*

Geobacter sulfurreducens wurde 1994 aus dem Sediment eines mit Kohlenwasserstoffen verunreinigten Grabens in Oklahoma, USA isoliert. Es handelt sich um ein aerotolerantes bis obligat anaerobes Bakterium, dessen Wachstumsoptimum bei einer Temperatur von 30 – 35 °C liegt. Zu den Elektronendonoren zählen Wasserstoff und Acetat. Als Elektronenakzeptoren dienen Eisen(III)-Verbindungen, Schwefel oder

Fumarat (Caccavo *et al.*, 1994; Aklujkar *et al.*, 2009; Lovley *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2004).

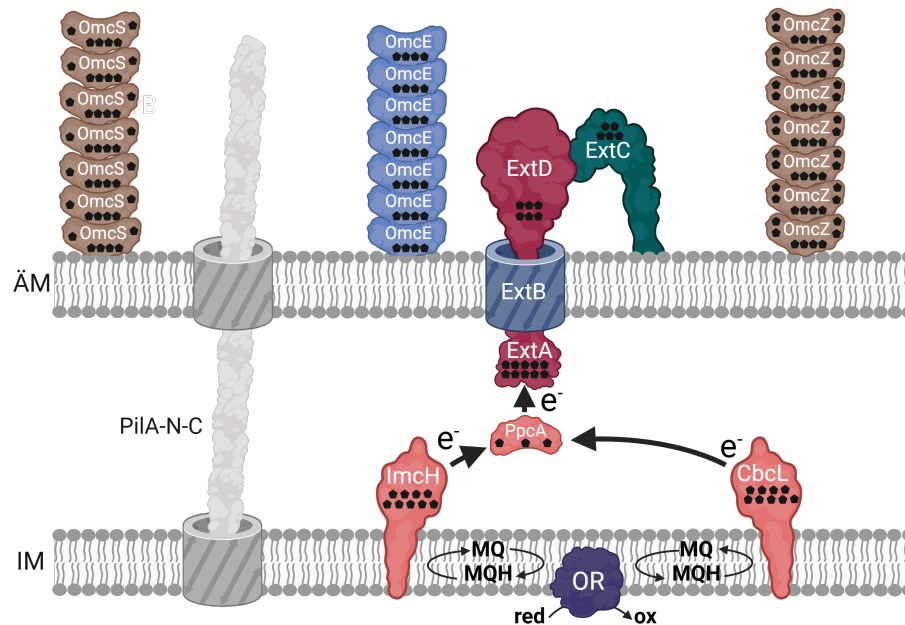


Abb. 3: **Schematischer Mechanismus des extrazellulären Elektronentransfers von *G. sulfurreducens*.** ImcH und CbcL übertragen Elektronen aus dem Menachinon-Pool (MQ/MQH) auf periplasmatische Proteine wie PpcA. Diese transportieren die Elektronen weiter auf die äußere Membran (ÄM), wobei der ExtABCD-Komplex hervorzuheben ist. Die extrazelluläre Elektronentransportkette wird darüber hinaus durch Nanowire aus OmcE, OmcS und OmcZ komplementiert. Die schwarzen Pentagone symbolisieren jeweils die Anzahl der Häm-Gruppen in den Cytochromen. IM steht für innere Membran und OR für Oxidoreduktase. Modifizierte Reproduktion nach Klein *et al.* (2023).

Im Wesentlichen basiert der EET von *G. sulfurreducens* ebenfalls auf *c*-Typ-Cytochromen und ist vergleichbar mit dem von *S. oneidensis*. Das Genom von *G. sulfurreducens* enthält 111 Gene für *c*-Typ-Cytochrome (Méthé *et al.*, 2003). Zehn dieser Cytochrome scheinen für die Elektronentransportkette hauptverantwortlich zu sein, wobei der Mechanismus vielschichtiger und komplexer, aber insgesamt weniger gut untersucht ist als bei *S. oneidensis* (Abbildung 3; Santos *et al.*, 2015).

Äquivalent zu CymA bei *Shewanella* übertragen die, in der inneren Membran verankerten Nonahäm-*c*-Typ-Cytochrome ImcH und CbcL, die cytoplasmatischen Elektronen aus dem Menachinon-Pool auf lösliche periplasmatische Cytochrome wie PpcA

(*Periplasmatic cytochrome A*; Lloyd *et al.*, 2003; Zacharoff *et al.*, 2016). An der äußeren Membran stehen verschiedene multimere Komplexe für den Elektronentransfer zur Verfügung, wobei der EET in BES hauptsächlich auf ExtABCD beruht (Otero *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2014).

Darüber hinaus verfügt *G. sulfurreducens* über bis zu 20 μm lange elektrisch leitfähige Proteinfilamente, welche beim Elektronentransport an unlösliche Akzeptoren eine essentielle Rolle einnehmen (Reguera *et al.*, 2005; Reguera *et al.*, 2006). Diese Filamente werden auch als Nanowire bezeichnet und sind für den Langstrecken-Elektronentransport von *Geobacter* unerlässlich. Nach aktuellem Stand sind die Strukturen von drei Nanowire-bildenden Cytochromen bekannt (OmcE, OmcS und OmcZ), wobei letzterem eine essentielle Rolle zur Bildung leitfähiger Biofilme auf Elektroden zugeschrieben wird. PilA-N hat selbst keine gesicherte direkte Rolle im Elektronentransport, nimmt jedoch eine wichtige Funktion zum extrazellulären Export der Cytochromfilamente ein. Die Nanowire von *Geobacter* scheinen im Vergleich zu *Shewanella* maßgeblichen Anteil an seiner vergleichsweise hohen Stromdichte in BES zu haben (Strycharz-Glaven *et al.*, 2011; Gralnick und Bond, 2023; Lovley und Holmes, 2020; Bonanni *et al.*, 2012).

1.2.3 Interaktion zwischen Bakterien und Anode

Zum terminalen Transfer extrazellulärer Elektronen auf die Anode können drei hypothetische Mechanismen dienen (Lovley, 2012), welche in Abbildung 4 veranschaulicht sind. Zum einen gibt es die Möglichkeit des klassischen direkten Elektronentransfers (a). Hierzu ist ein physischer Kontakt zwischen membranständigen *c*-Typ-Cytochromen und der Anode unerlässlich, da der Abstand für intermolekularen Elektronentransport maximal 10 Å (1 nm) betragen darf (Neal *et al.*, 2003; Kerisit

et al., 2007). In diesem Fall limitiert die verfügbare Elektrodenoberfläche die Anzahl der darauf kultivierbaren Mikroorganismen und damit die Anzahl der maximal übertragbaren Elektronen (Lovley, 2012). Es ist jedoch denkbar, dass ein elektrisch leitfähiger anodischer Biofilm den Elektronentransfer über mehrere Bakterien hinweg ermöglicht und so die Bildung mehrschichtiger Biofilme begünstigt.

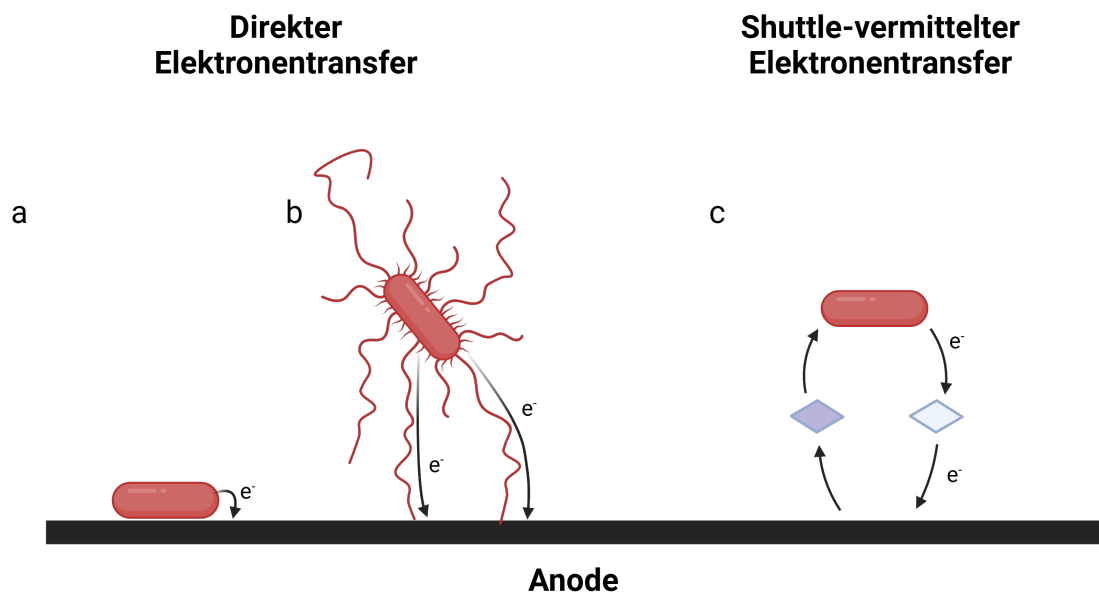


Abb. 4: **Mechanismen des Elektronentransfers von exoelektrogenen Bakterien auf eine Anode.** **a** zeigt den direkten Transfer durch physischen Kontakt zwischen Cytochromen und Anode und **b** zeigt den direkten Transfer über bakterielle Nanowire. In **c** ist der Shuttle-vermittelte Elektronentransfer dargestellt. Lösliche redoxaktive Verbindungen werden vom Bakterium reduziert, diffundieren zur Anode und werden oxidiert.

Der Elektronentransfer über bakterielle Nanowire stellt eine Erweiterung des klassischen direkten Elektronentransfers dar (b). Auch hier muss ein direkter Kontakt mit der Anode bestehen, jedoch kann das Bakterium selbst mehrere Mikrometer von der Anode entfernt sein, solange Teile seines Nanowire-Netzwerks mit der Elektrode in Kontakt sind. Dieser Mechanismus ist vor allem bei *G. sulfurreducens* gut untersucht, dessen Nanowire Längen von bis zu 20 μm erreichen und den direkten extrazellulären Elektronentransfer auf Anoden über verhältnismäßig weite Strecken

ermöglichen (Reguera *et al.*, 2005; Reguera *et al.*, 2006). Im Fall von *S. oneidensis* scheint es Ausstülpungen der äußeren Membran inklusive Periplasma zu geben, was einer Erweiterung der Zelloberfläche gleichkommt (Pirbadian *et al.*, 2014). Diese Ausstülpungen werden teilweise auch als Nanowire bezeichnet, erfüllen jedoch nicht dieselbe Funktion wie bei *G. sulfurreducens*.

Darüber hinaus bietet der Shuttle-vermittelte Elektronentransfer (c) eine dritte Variante zum Elektronentransfer auf Anoden. Hierbei reduzieren Cytochrome der äußeren Membran lösliche, redoxaktive extrazelluläre Elektronenakzeptoren. Diese sogenannten Elektronenshuttle können von den Mikroorganismen selbst sekretiert werden. *S. oneidensis* beispielsweise sekretiert Flavine zu diesem Zweck (Canstein *et al.*, 2007). Auch eine Zugabe synthetischer Elektronenshuttle wie Neutralrot oder Methylenblau ist möglich (Aiyer, 2020). Letzteres ist darüber hinaus membrangängig und dadurch auch in der Lage, im Zellinneren Elektronen aufzunehmen und diese an extrazelluläre Akzeptoren zu transferieren. Die Elektronenshuttle werden an oder in der Zelle reduziert, diffundieren dann an die Anode, wo sie oxidiert werden und anschließend für einen weiteren Redoxzyklus zur Verfügung stehen. Für den Shuttle-vermittelten Elektronentransfer ist also kein direkter Anodenkontakt notwendig, was die indirekte elektronische Konnektierung planktonischer Zellen oder im Biofilm weiter von der Anode entfernter Zellen ermöglicht. Dieser Mechanismus des extrazellulären Elektronentransports ist vor allem für *S. oneidensis* in Batch-Systemen von hoher Relevanz und dort für etwa 75 % des Elektronentransports zuständig (Kotloski und Gralnick, 2013). In Durchflusssystemen kommt ihnen eine untergeordnete Rolle zu, da die Shuttle-Moleküle hier konstant ausgewaschen werden (Engel *et al.*, 2019).

1.3 Biofilme im BES

Die meisten biotechnologischen Reaktoren in Industrie und Forschung basieren nach heutigem Stand auf der Kultivierung und Nutzung planktonischer Mikroorganismen. In einer natürlichen Umgebung lebt der Großteil aller Bakterien jedoch in Form von Biofilmen (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Darunter versteht man aggregierte Gemeinschaften von Mikroorganismen, die an einer Oberfläche haften und von einer selbstproduzierten Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) umgeben sind (Donlan, 2002). Die EPS-Matrix besteht primär aus Polysacchariden, Proteinen, Lipiden sowie extrazellulärer DNA und ist abundant im Biofilm vorhanden. Sie immobilisiert die eingebetteten Bakterien und verleiht ihnen darüber hinaus Schutz vor externen schädlichen Umwelteinflüssen wie Strahlung, toxischen Substanzen oder sich schnell ändernden Prozessparametern (Flemming und Wingender, 2010; Flemming *et al.*, 2016; Yin *et al.*, 2019; Brunner *et al.*, 2019; Härrer *et al.*, 2023). Darüber hinaus verfügen Biofilme über hohe Zelldichten und erlauben die verhältnismäßig einfache Implementierung kontinuierlicher biotechnologischer Prozessbedingungen (Morgan-Sagastume *et al.*, 2008; Philipp *et al.*, 2024). Trotz dieser vielfältigen vorteilhaften Eigenschaften sind Biofilme weitgehend unzureichend erforscht und es bedarf weiterhin der Aufdeckung grundlegender Erkenntnisse.

Die Biofilmbildung und -entwicklung unterliegt einem dynamischen Prozess, welcher drei grundlegende Ereignisse (Aggregation, Proliferation, Disaggregation) beinhaltet und vereinfacht folgendermaßen abläuft: Zellen aggregieren zunächst untereinander und/oder haften sich als Einzelzellen an eine Oberfläche, daraufhin expandieren die angehafteten Zellen durch Wachstum und Rekrutierung von Zellen aus der Umgebung. Aus diesem maturierten Biofilm können sich wiederum einzelne Zellen oder Aggregate lösen und in die planktonische Phase übergehen (Sauer *et al.*, 2022). Die Umgebungsbedingungen beeinflussen die Biofilmarchitektur maßgeblich. So

können beispielsweise Biofilme von *S. oneidensis* unter oxischer, anoxischer oder anodischer Kultivierung völlig unterschiedliche Ausprägungen in Höhe, Volumen oder Porosität aufweisen (Klein *et al.*, 2024b; Philipp *et al.*, 2024).

Auch in BES besiedeln exoelektrogene Bakterien vorrangig die Elektroden und bilden dort Biofilme. Dies ermöglicht neben den oben genannten Vorteilen zusätzlich einen direkten (und Nanowire-vermittelten) Elektronentransport. Auf Anoden formiert *S. oneidensis* dünne Biofilme, in denen sich jede Zelle in direktem Elektrodenkontakt befindet (Mclean *et al.*, 2010; Kitayama *et al.*, 2017). Es kann also davon ausgegangen werden, dass *Shewanella*-Biofilme wenig bis nicht elektrisch leitfähig sind. *G. sulfurreducens* hingegen bildet, aufgrund seines konduktiven Netzwerks aus Nanowires, leitfähige Biofilme und kann hierbei eine Höhe von über 100 μm erreichen. Die auf der Anode lokalisierte Zellzahl ist also deutlich höher, was zur Folge hat, dass die bisher höchsten Energieausbeuten in BES mit *Geobacter*-Spezies erzielt wurden (Torres *et al.*, 2010; Franks *et al.*, 2009; Malvankar *et al.*, 2012). Das anodische Biofilmwachstum von *G. sulfurreducens* wird hauptsächlich durch Substratgradienten, Protonengradienten und Elektronentransportgradienten innerhalb des Biofilms limitiert (Torres *et al.*, 2008; Babauta *et al.*, 2012). Obwohl *G. sulfurreducens* deutlich höhere Energieausbeuten in BES aufweist, ist *S. oneidensis* dennoch ein äußerst vielversprechender Kandidat für zukünftige BES-Anwendungen. *S. oneidensis* weist im Gegensatz zu *G. sulfurreducens* Eigenschaften wie genetische Zugänglichkeit, einen fakultativ anaeroben Lebensstil sowie ein breites Substratspektrum auf, welche eine biotechnologische Anwendung dieses Organismus deutlich vereinfachen (Kneuer *et al.*, 2024).

1.4 Optimierung von BES

Eine Optimierung der Grenzfläche zwischen Anode und elektroaktiven Bakterien ist für zukünftige großtechnische Anwendungen unerlässlich. Hierzu bieten sich verschiedene Strategien zur Überwindung effizienzlimitierender Faktoren. Grundlegend ist allen Ansätzen gemein, dass die Anzahl der auf die Anode übertragenen respiratorisch anfallenden Elektronen pro Zeiteinheit erhöht werden soll. Dies kann erreicht werden, indem möglichst viele Zellen mit der Elektrode konnektiert werden, der Stofftransport oder die elektrische Leitfähigkeit im Biofilm verbessert wird, um Diffusionslimitierungen zu umgehen, oder indem der EET der einzelnen Mikroorganismen optimiert wird.

Es kann zwischen drei Kategorien zur Optimierung der Anoden-Bakterien-Grenzfläche in BES unterschieden werden, wobei die Übergänge fließend und nicht klar abzugrenzen sind: gentechnische Optimierung, chemische Modifikation der Grenzfläche und Immobilisierung der Zellen auf der Anode (Klein *et al.*, 2023).

Beim gentechnischen Ansatz sind vielfältige Optimierungsmöglichkeiten bekannt. So kann unter anderem an der Biofilmbildung oder Elektronentransportkette gearbeitet werden, um das Verständnis der dort ablaufenden Prozesse zu erweitern und bessere Ausbeuten zu erhalten (Sydow *et al.*, 2014; Philipp *et al.*, 2020; Bird *et al.*, 2021).

Die Immobilisierung von Bakterien auf der Anode erfolgt in der Regel durch den Einsatz von Hydrogelen aus Materialien wie Alginat, Agarose oder leitfähigen Polymeren wie PEDOT:PSS. Sie können die Leitfähigkeit der Grenzfläche zwischen Anode und Zellen sowie die Zellzahl auf der Anode erhöhen (Knoll *et al.*, 2022; Hu *et al.*, 2020; Zajdel *et al.*, 2018).

Das Elektrodenmaterial spielt eine entscheidende Rolle bei der Leistungsfähigkeit

von BES. Metalle wie Silber, Gold, Kupfer oder Eisen sind bekannt für ihre antibakteriellen Eigenschaften durch den oligodynamischen Effekt. Es wird davon ausgegangen, dass Proteine durch freierwerdende Metallionen denaturiert werden, was wichtige Zellfunktionen beeinträchtigt (Shrestha *et al.*, 2009). Exoelektrogene Bakterien scheinen hingegen gegenüber Schwermetallionen resistent zu sein und sind sogar dazu in der Lage, Biofilme auf solchen Metalloberflächen zu bilden. Dies ermöglicht den Einsatz dieser Metalle als Anodenoberfläche im BES. Daneben werden kohlenstoffbasierte Elektrodenmaterialien wie Graphit häufig verwendet (Baudler *et al.*, 2015). Die Elektrodenoberfläche kann sowohl bei kohlenstoff- als auch metallbasierten Systemen durch Oberflächenfunktionalisierung optimiert werden, was beispielsweise die Anhaftung von Bakterien vereinfacht oder die Leitfähigkeit der Grenzfläche erhöht (Li und Cheng, 2019).

Die Toleranz exoelektrogener Mikroorganismen gegenüber Metallionen erlaubt auch den Einsatz metallischer NPs zur Optimierung. So wurde unter anderem durch Funktionalisierung der Oberfläche von *S. oneidensis* mit Fe_3O_4 und Gold NPs, die zelluläre Leitfähigkeit erhöht. Die funktionalisierten Zell-Hybride wurden mittels einer magnetischen Anode angezogen und wiesen verbesserte Energieausbeuten im BES auf (Jiang *et al.*, 2020). Ein vergleichbarer Ansatz mit Fe_3O_4 /Kohlenstoff-Komposit-NPs wurde mit *G. sulfurreducens* verfolgt (Cheng *et al.*, 2022; Zhou *et al.*, 2018). Der Einsatz magnetischer NPs adressiert parallel die Immobilisation der Bakterien auf der Anode sowie die Modifikation ihrer Grenzfläche. Darüber hinaus gibt es eine große Zahl an Forschungsarbeiten zur Optimierung von BES mit weiteren Nanomaterialien (Xu *et al.*, 2012; Erben *et al.*, 2021; Cornejo *et al.*, 2018; Ye *et al.*, 2021; Klein *et al.*, 2023). So konnte exemplarisch durch Einsatz von *carbon dots* oder Silber-NPs die Stromdichte in BES um ein Vielfaches erhöht werden (Cao *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2020).

Der Einsatz von NPs führt nicht nur zu einer erhöhten Elektronentransferrate sondern vergrößert darüber hinaus auch die verfügbare Elektrodenoberfläche, da die Zell-NP-Agglomerate eine konduktive Erweiterung der bestehenden Elektrode darstellen. Die Architektur dieser biohybriden Materialien und der Einfluss der vergrößerten Elektrodenoberfläche auf die Stromausbeuten wurde bisher nicht bis kaum thematisiert oder quantifiziert. Außerdem beschränken sich nahezu alle Studien hierzu auf Batch-Reaktoren. Zukünftige Anwendungen werden jedoch voraussichtlich im kontinuierlichen Durchfluss betrieben, was einen robusten direkten Elektronentransfer noch wichtiger macht, da Shuttle-Moleküle ausgewaschen werden (Engel *et al.*, 2019).

Schlussendlich sollte eine auf das jeweilige System zielgerichtete Kombination verschiedener Optimierungsmöglichkeiten angestrebt werden, um möglichst hohe Ausbeuten erzielen zu können. Einige aktuelle Übersichtsartikel widmen sich dieser vielschichtigen Thematik im Detail (Sydow *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2018; Philipp *et al.*, 2020; Bird *et al.*, 2021; Klein *et al.*, 2023).

1.5 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vorrangig zwei Forschungsfragen behandelt. Zunächst sollten durch den Einsatz magnetischer, leitfähiger NPs dynamische dreidimensionale Elektrodenstrukturen auf einer Anode assembliert und charakterisiert werden, um die aktive Elektrodenoberfläche zu vergrößern. Hierzu wurde eine kürzlich entwickelte bioelektrochemische Mikrofluidikplattform eingesetzt, welche eine *in-situ*-Bildgebung mittels optischer Kohärenztomographie (OCT) ermöglicht. Nach erfolgreicher optischer und elektrochemischer Charakterisierung sollte daraufhin der Einfluss dieser abiotischen NPs auf die exoelektrogenen Modellorganismen *S. oneidensis* und *G. sulfurreducens* untersucht werden. Hierzu wurden unter anderem Zellviabilitätsassays sowie bioelektrochemische Messungen durchgeführt.

Basierend auf den dadurch gewonnenen Erkenntnissen, wurde außerdem ein Ansatz verfolgt, bei dem die Biosynthese magnetischer NPs durch *S. oneidensis* forciert wurde. Die so erzeugten magnetischen Biohybride wurden anschließend ebenfalls in der bioelektrochemischen Mikrofluidikplattform auf ihre Eigenschaften und Performance hin analysiert.

Die Forschungsergebnisse sollen einen Beitrag zum Grundverständnis exoelektrogener Biofilme leisten, Möglichkeiten ihrer materialwissenschaftlichen Optimierung und gezielten Lokalisation aufzeigen sowie potentielle zukünftige industrielle Anwendungen erleichtern.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von Air Liquide (Ludwigshafen, Deutschland), AppliChem (Darmstadt, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Promega (Mannheim, Deutschland), Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland) oder Sigma Aldrich (Deisenhof, Deutschland) bezogen.

2.2 Mikroorganismen

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden die in Tabelle 1 aufgelisteten Bakterienstämme verwendet.

Tab. 1: **Liste der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.**

<i>Stamm</i>	<i>Genotyp</i>	<i>Referenz</i>
JG7	<i>S. oneidensis</i> MR-1	Venkateswaran <i>et al.</i> , 1999
JG407	<i>G. sulfurreducens</i> PCA	Caccavo <i>et al.</i> , 1994

2.3 Kulturmedien und Wachstumsbedingungen

Alle verwendeten wässrigen Lösungen wurden mit zweifach deionisiertem Wasser aus einer Reinstwasseranlage (PURELAB Plus, Veolia Water Technologies Deutschland, Celle) hergestellt. Kulturmedien wurden anschließend für 20 min bei 121 °C und

1 bar Überdruck autoklaviert. Anoxische Medien wurden zuvor in mit Septum verschlossenen Flaschen für mindestens 30 min durch alternierende zweiminütige Begasungs- (80 % N₂/20 % CO₂) und Vakuumzyklen anaerobisiert. Thermolabile Substanzen wurden zu den bereits autoklavierten Medien durch Sterilfilter (0,2 µm, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) zugegeben.

Zur flüssigen Vorkultivierung von *S. oneidensis* in oxischer Umgebung, wurde LB-Medium (engl.: *lysogeny broth*) verwendet. In Tab. 2 ist die Zusammensetzung der Medien aufgelistet.

Tab. 2: Zusammensetzung der LB-Medien zur Anzucht von *S. oneidensis*.

<i>Substanz</i>	<i>LB</i>	<i>LB-Agar</i>
Trypton [g l ⁻¹]	10	10
Hefeextrakt [g l ⁻¹]	5	5
NaCl [g l ⁻¹]	5	5
Agar-Agar [g l ⁻¹]	-	20

Zur Komplementierung der weiteren Kulturmedien wurden Selenit-Wolframat-Lösung (Tab. 3), Spurenelementlösung (Tab. 4), Vitaminlösung (Tab. 5) sowie Salzlösung (Tab. 6) benötigt.

Tab. 3: Zusammensetzung der Selenit-Wolframat-Lösung (1000X).

<i>Substanz</i>	<i>mg l⁻¹</i>	<i>µM</i>
NaOH	500	12,5
Na ₂ SeO ₃	3	17
Na ₂ WO ₄ x 2 H ₂ O	4	12

Zur Anzucht anoxischer Vorkulturen von *S. oneidensis* und *G. sulfurreducens* wurden die in Tab. 7 und Tab. 8 aufgeführten Nährmedien verwendet.

Tab. 4: Zusammensetzung der Spurenelementlösung (100X).

<i>Substanz</i>	<i>g l⁻¹</i>	<i>mM</i>
Nitriloessigsäure (mit KOH auf pH 6,5)	2,140	11,20
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,100	0,51
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,300	1,08
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,170	0,71
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,200	0,70
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	0,300	1,76
AlK(SO ₄) ₂ x 12 H ₂ O	0,005	0,01
H ₃ BO ₃	0,005	0,08
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,110	0,45
NiSO ₄ x 6 H ₂ O	0,110	0,41
Na ₂ WO ₄ x 2 H ₂ O	0,200	0,61
pH = 7,0.		

Tab. 5: Zusammensetzung der Vitaminlösung (1000X).

<i>Substanz</i>	<i>mg l⁻¹</i>
Biotin	2,0
Folsäure	2,0
Pyridoxin-HCl	10,0
Thiamin-HCl	5,0
Riboflavin	5,0
DL-Ca-Pantothenat	5,0
Nicotinsäure	5,0
Cobalamin	0,1
<i>p</i> -Aminobenzoessäure	5,0
Liponsäure	5,0

Tab. 6: Zusammensetzung der Salzlösung (10X).

<i>Substanz</i>	<i>g l⁻¹</i>	<i>mM</i>
KH ₂ PO ₄	0,420	3,09
K ₂ HPO ₄	0,220	1,26
NH ₄ Cl	0,200	3,74
KCl	0,380	5,10
NaCl	0,360	6,16

Tab. 7: Zusammensetzung des Mediums zur anoxischen Kultivierung von *S. oneidensis*.

<i>Substanz</i>	<i>g l⁻¹</i>	<i>ml l⁻¹</i>	<i>mM</i>
Salzlösung (siehe Tab. 6)		100	
NaHCO ₃	1,800		21,43
Na ₂ CO ₃	0,500		4,72
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,213		1,05
Casaminosäuren	1,000		
Na-D,L-Laktat (60 %)	13,070		70
Spurenelemente (siehe Tab. 4)		10	
Selenit-Wolframat (siehe Tab. 3)		1	
Na-Fumarat	11,600		100
HEPES	11,915		50

Anaerobisieren mit 80 % N₂/20 % CO₂ und anschließend autoklavieren. Komplementieren mit 1 ml 0,2 M Na-Ascorbat-Lösung und 1 ml 0,4 M CaCl₂ x 2 H₂O. pH = 7,0.

Tab. 8: Zusammensetzung des Mediums zur anoxischen Kultivierung von *G. sulfurreducens*.

<i>Substanz</i>	<i>g l⁻¹</i>	<i>ml l⁻¹</i>	<i>mM</i>
Salzlösung (siehe Tab. 6)		100	
NaHCO ₃	1,800		21,43
Na ₂ CO ₃	0,500		4,72
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,213		1,05
Casaminosäuren	1,000		
Na-Acetat	1,230		15
Spurenelemente (siehe Tab. 4)		10	
Selenit-Wolframat (siehe Tab. 3)		1	
Na-Fumarat	4,643		40

Anaerobisieren mit 80 % N₂/20 % CO₂ und anschließend autoklavieren. Komplementieren mit 10 ml Vitaminlösung (siehe Tab. 5), 1 ml 0,2 M Na-Ascorbat-Lösung und 1 ml 0,4 M CaCl₂ x 2 H₂O. pH = 7,0.

Zur anodischen Kultivierung von *S. oneidensis* und *G. sulfurreducens* in der bioelektrochemischen Mikrofluidikplattform (siehe Abschnitt 2.7) wurden die in Tab. 9 und Tab. 10 beschriebenen Medien verwendet.

Tab. 9: Zusammensetzung des Mediums zur anodischen Kultivierung von *S. oneidensis*.

<i>Substanz</i>	<i>g l⁻¹</i>	<i>ml l⁻¹</i>	<i>mM</i>
Salzlösung (siehe Tab. 6)		100	
NaHCO ₃	1,800		21,43
Na ₂ CO ₃	0,500		4,72
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,213		1,05
Casaminosäuren	0,100		
Na-D,L-Laktat (60 %)	3,730		20
Spurenelemente (siehe Tab. 4)		10	
Selenit-Wolframat (siehe Tab. 3)		1	
HEPES	11,915		50

Autoklavieren und anschließend komplementieren mit 10 ml Vitaminlösung (siehe Tab. 5), 1 ml 0,2 M Na-Ascorbat-Lösung und 1 ml 0,4 M CaCl₂ x 2 H₂O. pH = 7,0.

Tab. 10: Zusammensetzung des Mediums zur anodischen Kultivierung von *G. sulfurreducens*.

<i>Substanz</i>	<i>g l⁻¹</i>	<i>ml l⁻¹</i>	<i>mM</i>
Salzlösung (siehe Tab. 6)		100	
NaHCO ₃	1,800		21,43
Na ₂ CO ₃	0,500		4,72
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,213		1,05
Casaminosäuren	0,100		
Na-Acetat	1,640		20
Spurenelemente (siehe Tab. 4)		10	
Selenit-Wolframat (siehe Tab. 3)		1	
HEPES	11,915		50

Autoklavieren und anschließend komplementieren mit 10 ml Vitaminlösung (siehe Tab. 5), 1 ml 0,2 M Na-Ascorbat-Lösung und 1 ml 0,4 M CaCl₂ x 2 H₂O. pH = 7,0.

Zur biogenen Synthese magnetischer FeS-Nanopartikel durch *S. oneidensis* wurde das in Tab. 11 beschriebene Kulturmedium genutzt.

Die Kultivierung von Zellen erfolgte ausgehend von, bei -80 °C cryokonservierten, Gefrierkulturen. *S. oneidensis* wurde hierzu zunächst auf LB-Agar-Platten (Tabelle 2) ausgestrichen und bei 30 °C inkubiert. Kulturen in LB-Flüssigmedien wurden mit Einzelkolonien von diesen Platten inokuliert und bei 30 °C und 180 rpm inkubiert. Bei Bedarf wurde anschließend in anoxisches Vorkulturmedium (Tabelle 7) überführt. Zur Kultivierung von *G. sulfurreducens* wurden 2 ml einer Cryo-Kultur in 500 ml anoxisches Vorkulturmedium (Tabelle 8) überführt und bei 30 °C inkubiert. Aus dieser Kultur wurde bei Bedarf erneut in frisches Medium überführt.

Tab. 11: **Zusammensetzung des Mediums zur biogenen Synthese magnetischer FeS-Nanopartikel durch *S. oneidensis*.**

<i>Substanz</i>	<i>g l⁻¹</i>	<i>ml l⁻¹</i>	<i>mM</i>
Salzlösung (siehe Tab. 6)		100	
NaHCO ₃	1,800		21,43
Na ₂ CO ₃	0,500		4,72
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,213		1,05
Na-D,L-Laktat (60 %)	3,730		20
Spurenelemente (siehe Tab. 4)		10	
Selenit-Wolframat (siehe Tab. 3)		1	
HEPES	11,915		50

Anaerobisieren mit 80 % N₂/20 % CO₂ und anschließend autoklavieren. Komplementieren mit 10 ml anaerobisierter 0,2 M FeCl₃-Lösung und 10 ml anaerobisierter 0,5 M Na₂S₂O₃-Lösung. pH = 7,0.

2.4 Wachstumskurven

Wachstumskurven von *S. oneidensis* wurden in einem Infinite200Pro Plate Reader (Tecan Trading AG, Schweiz), bis zum Erreichen der stationären Phase, durchgeführt. Vorkulturen wurden über Nacht in LB-Medium bei 30 °C und 180 rpm inkubiert. Die Experimente wurden in Quadruplikaten in einer 12-Well-Mikrotiterplatte in An- und Abwesenheit von 100 µg ml⁻¹ PEDOT:PSS funktionalisierter NPs (siehe Abschnitt 2.6) im Kulturmedium bei 30 °C und 180 rpm durchgeführt. Die optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) in einem 15-Minuten-Intervall gemessen, wobei ein Ausgangswert von 0,03 gewählt wurde. Die Wells der Mikrotiterplatte wurden jeweils mit 2 ml Medium befüllt.

2.5 Bradford-Assay

Um die Zellzahl von *S. oneidensis* in Medien zur biogenen Synthese magnetischer Nanopartikel (Tabelle 11) zu bestimmen, konnte nicht auf Messung der optischen Dichte zurückgegriffen werden, da die *in situ* produzierten NPs selbst Licht streuen und somit die Messung verfälschen würden. Aus diesem Grund wurde die Zellzahl indirekt über eine Bestimmung des Gesamtproteingehalts nach Bradford (1976) gemessen. Hierfür wurden die Proben zunächst mit NaOH versetzt (Zielkonzentration: 200 mM) und 5 min bei 95 °C lysiert. 20 µl Lysat wurden mit 180 µl Bradfordreagenz (Tabelle 12) versetzt, resuspendiert und 20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Der Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau bildet in saurem Milieu Komplexe mit kationischen und unpolaren Seitenketten der Aminosäuren, was eine Verschiebung seines Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm zur Folge hat. Mithilfe einer Eichgeraden beruhend auf einem BSA-Standard bekannter Konzentration, können so die Proteinkonzentrationen der betreffenden Proben bestimmt und verglichen werden. Die Absorption wurde mit einem iMark™ Plate Reader (Bio-Rad, Feldkirchen) bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen.

Tab. 12: **Zusammensetzung der Bradford-Lösung.**

<i>Substanz</i>	<i>mg l⁻¹</i>	<i>ml l⁻¹</i>
Coomassie-Brillant-Blau G-250	100	
Konz. H ₃ PO ₄		100
96 % Ethanol		50
Mit ddH ₂ O auf 1000 ml auffüllen.		

2.6 Vorbehandlung der Nanopartikel

Sofern magnetische NPs extern zugegeben wurden, mussten diese zunächst in wässrigen Medien dispergierbar gemacht werden (Wurst *et al.*, 2024). Hierzu wurden 10 µg steriles Eisenanopulver mit hydrophober Kohlenstoffhülle (> 83 % Fe, < 14 % C, APS < 60 nm; PlasmaChem GmbH, Berlin) zu 1 ml sterilem PEDOT:PSS (1,5 % in H₂O, neutral pH, *high-conductivity grade*; Merck KGaA, Darmstadt) gegeben. Die Suspension wurde 10 min in einem Ultraschallbad bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend direkt zur betreffenden Zellsuspension gegeben.

2.7 Bioelektrochemische Mikrofluidikplattform

Die Kultivierung exoelektrogener Biofilme wurde in einer bioelektrochemischen Mikrofluidikplattform, basierend auf der Arbeit von Hansen *et al.* (2019) und weiterentwickelt durch Klein *et al.* (2024a), durchgeführt. Alle eingesetzten Mikrofluidikreaktoren wurden aus Polydimethylsiloxan (PDMS) gefertigt. Hierfür kam das Sylgard® 184 Silicone Elastomer Kit (Dow Corning, Michigan, USA) zum Einsatz. Das Elastomer wurde in Negativformen aus Messing gegossen und bei einer Temperatur von mindestens 60 °C über einen Zeitraum von einer Stunde ausgehärtet. Der Einsatz von Platzhalterkanülen ermöglichte den individuellen Zugang zum Kultivierungskanal. Zusätzlich wurde eine 10 x 10 mm große Aussparung mittig am Kultivierungskanal geschaffen, welche das nachträgliche Einsetzen von Graphit-Elektroden ermöglichte. Dies geschah durch ein weiteres, von oben eingesetztes und verschraubtes Messingteil. Nach dem Aushärten wurde der Silikonkörper vorsichtig von der Negativform gelöst.

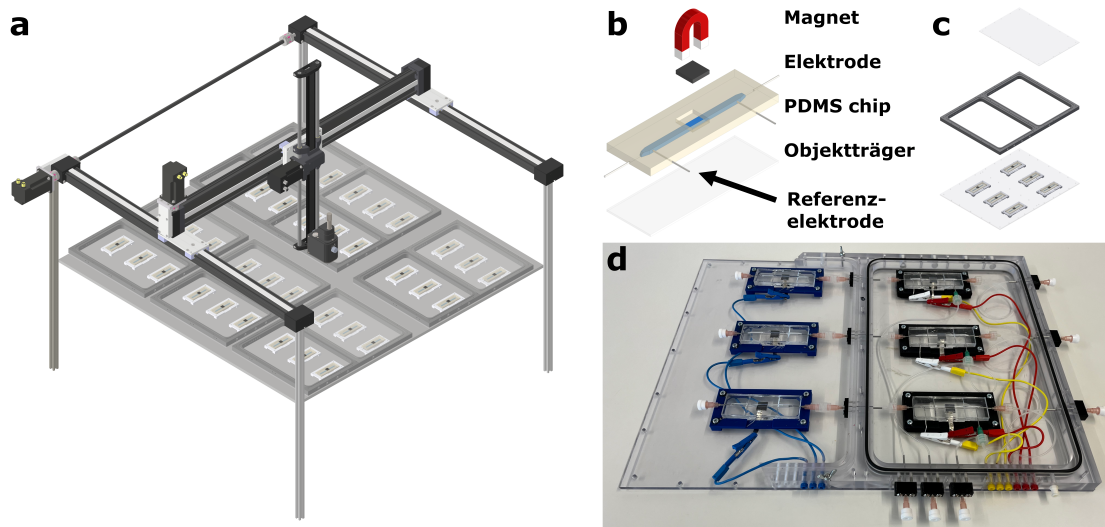


Abb. 5: **Bioelektrochemische Mikrofluidikplattform zur Kultivierung und Analyse elektroaktiver Biofilme und anodischer Mikrostrukturen.** Die mikrofluidische Kultivierungsplattform ermöglicht den gleichzeitigen Durchsatz von bis zu sechs Triplikaten zur kontinuierliche Kultivierung von Biofilmen (a). Durch die Integration eines optischen Kohärenztomographen in ein Raumportal können Mikrostrukturen *in situ* untersucht werden. Die mikrofluidischen Reaktoren (b) bestehen aus Polydimethylsiloxan (PDMS), und der Kanal wird durch Plasmabonding mit einem Glasobjektträger versiegelt. In der Mitte des Kanals ist eine 10×10 mm große Graphitelektrode integriert und weitere Zugänge ermöglichen das Einführen von Kanülen sowie der Referenzelektrode. Nach Bedarf kann zusätzlich ein Magnet hinter der Anode platziert werden. Ein Triplikats, jeweils bestehend aus zwei mikrofluidischen Reaktoren (anodischer und kathodischer Reaktor), passt in eine Kammer (c), die aus einer Bodenplatte, einem Rahmen und einem Deckel besteht. Der Deckel ist auf dem anodischen Kompartiment angebracht, damit die Kultivierung unter anoxischen Bedingungen durchgeführt werden kann. In d ist ein Foto eines einsatzbereiten Triplikats zu sehen. Modifizierte Reproduktion nach Klein *et al.* (2024a).

Die Reaktorunterseite mit dem freiliegenden Kanal wurde durch Sauerstoffplasmabehandlung (Plasma Flecto10, Plasma Technology, Herrenberg, Deutschland) kovalent an einen Glasobjektträger (1 mm Stärke) gebunden. Die finalen Abmessungen der gegossenen Reaktoren betragen $76 \text{ mm} \times 26 \text{ mm}$ (Länge x Breite) und entsprechen damit den Standardmaßen eines herkömmlichen Glasobjektträgers.

Es wurden zwei verschiedene mikrofluidische Reaktoren hergestellt (Volumen: $354 \mu\text{l}$), welche sich lediglich durch An- und Abwesenheit zweier seitlich vorhandener Platzhalterkanülen unterschieden (Abbildung 5b). Reaktoren mit seitlichen Platzhalterkanülen wurden im späteren bioelektrochemischen System (BES) für die Arbeitselektroden

verwendet, wobei ein seitlicher Zugang zur Inokulation der Mikroorganismen genutzt wurde und der andere Zugang den Einsatz einer selbst hergestellten Ag/AgCl-(Pseudo)-Referenzelektrode (siehe Abschnitt 2.8.3) ermöglichte. In die mittige Aussparung wurde außerdem eine 10 x 10 x 3 mm Graphit-Polypropylen-Komposit-Elektrode (Eisenhuth GmbH, Osterode; Material PPG 86) eingesetzt, welche durch Korundstrahlung aufgeraut wurde. Sofern benötigt, wurden zusätzlich Neodym-Permanentmagnete (10 x 10 x 1,2 mm, bzw. 10 x 10 x 5 mm) direkt hinter der Arbeitselektrode platziert. Der Reaktor ohne seitliche Platzhalter diente als Gegenelektrode im BES und wurde mit einer 10 x 10 x 1 mm Graphitelektrode (Müller & Rössner GmbH, Troisdorf) versehen. Um eine zuverlässige elektrische Verbindung zu einem Potentiostaten (BioLogic VMP-300; Seyssinet-Pariset, Frankreich) zu ermöglichen, wurden die Graphitelektroden jeweils mit einem Tropfen Silber-Leitlack an ein Silberblech (0,1 mm; Chempur, Karlsruhe) konnektiert und anschließend mit PDMS verschlossen. Technische Zeichnungen der mikrofluidischen Reaktoren sowie der zugehörigen Gießformen können der Dissertation von Dr. Edina Klein entnommen werden.

Um anoxische Bedingungen zur Kultivierung der Mikroorganismen zu gewährleisten, wurde ein gasdichter Aufbau aus zwei Kammern konzipiert, in dem der anodische Mikrofluidikreaktor durchgehend einer anoxischen Umgebung aus 80 % N₂ und 20 % CO₂ ausgesetzt wurde, während sich der kathodische Reaktor in oxischer Umgebung befand. Diese Mikrofluidikplattform wurde so dimensioniert, dass pro Versuchsaufbau ein biologisches Triplikat, jeweils bestehend aus einem anodischen und einem kathodischen Reaktor, beherbergt werden konnte (Abbildung 5c, d). Um Echtzeit-Monitoring via OCT (Abschnitt 2.9.1) zu ermöglichen, wurden die mikrofluidischen Reaktoren mit der Glasseite nach oben platziert. Die Platzhalterkanülen wurden durch stumpfe Kanülen mit einem Innendurchmesser von 0,95 mm (für Mediumszu- und ablauf) bzw.

0,57 mm (für Inokulation) ersetzt und die Reaktoren über Luer-Verbinder, Kanülen sowie Silikonschläuche (Carl Roth, Karlsruhe; Innendurchmesser 1 mm) miteinander verbunden. Ein konstanter Durchfluss von Nährmedium (Flussrate: 4 ml h⁻¹; hydraulische Retentionszeit: 5,3 min) wurde über Reglo ICC Peristaltikpumpen (ISMATEC Industry Solutions GmbH, Grevenbroich) sichergestellt. Silikonschläuche außerhalb des Versuchsaufbaus verfügten über einen Innendurchmesser von 1,5 mm. Zur Inokulation wurden darüber hinaus gasdichte Fluorkautschukschläuche (ID: 1,5 mm) eingesetzt. Vor der Inokulation wurde der Versuchsaufbau für mindestens eine Stunde mit 70 % Ethanol gespült und anschließend für mindestens 12 h mit Kulturmedium äquilibriert. Die Mikrofluidikplattform wurde bei einer konstanten Temperatur von 30 °C inkubiert.

Als Inokulum dienten in dieser Arbeit Kulturen von *S. oneidensis* oder *G. sulfurreducens*, welche vor der Inokulation folgendermaßen aufbereitet wurden: *S. oneidensis* wurde in 50 ml LB-Medium (Tabelle 2) angeimpft. Nach Inkubation unter Schütteln (180 rpm) bei 30 °C über Nacht wurde in 200 ml anoxisches Anzuchtmedium (Tabelle 7) überimpft und ruhend bei 30 °C über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden mit Waschpuffer (1X-Salzlösung; vgl. Tabelle 6) gewaschen, im Medium zur anodischen Kultivierung (Tabelle 9) resuspendiert und auf eine optische Dichte (OD₆₀₀) von 2,0 eingestellt. Experimente, bei denen PEDOT:PSS-Aggregate gebildet werden sollten, wurden hier zusätzlich mit 40 mM Fumarat supplementiert. Sollten durch *S. oneidensis* biogene Nanopartikel synthetisiert werden, wurden die Zellen nach dem Waschen in das dafür vorgesehene Medium transferiert (Tabelle 11) und anschließend für weitere 24 h ruhend bei 30 °C inkubiert. In diesem Fall wurde daraufhin direkt ohne weitere Waschschrte in die bioelektrochemische Mikrofluidikplattform inokuliert.

G. sulfurreducens wurde für 36 h ruhend bei 30 °C in 200 ml anoxischem Vorkulturmedium (Tabelle 8) inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin mit Waschpuffer (1X-Salzlösung; vgl. Tabelle 6) gewaschen, im Medium zur anodischen Kultivierung (Tabelle 10) resuspendiert und auf eine optische Dichte von 2,0 eingestellt.

Zur Inokulation in die bioelektrochemische Mikrofluidikplattform wurden jeweils 4 ml der betreffenden Kultur über Spritzenpumpen mit einer Geschwindigkeit von 2 ml h⁻¹ durch den Inokulationsport zugegeben. Während der Inokulation wurde die Flussgeschwindigkeit der Hauptpumpen von 4 ml h⁻¹ auf 2 ml h⁻¹ abgesenkt, um eine gleichbleibende Gesamtflussgeschwindigkeit von 4 ml h⁻¹ zu gewährleisten.

2.8 Elektrochemische Methoden

2.8.1 Chronoamperometrie

Um die Stromdichten der elektroaktiven Biofilme in der bioelektrochemischen Mikrofluidikplattform zu ermitteln und zu vergleichen, wurde auf eine chronoamperometrische Messmethode zurückgegriffen. Hierzu wurde an der Arbeitselektrode ein Potential von -0,199 V gegenüber einer Ag/AgCl(-Pseudo)-Referenzelektrode angelegt, was 0 V gegenüber einer Standardwasserstoffelektrode (engl.: *standard hydrogen electrode*, SHE) entspricht. Die Stromdichte wurde in einem Messintervall von 60 Sekunden aufgenommen.

Die Herstellung der Ag/AgCl(-Pseudo)-Referenzelektroden (Abschnitt 2.8.3) erfolgte ebenfalls chronoamperometrisch.

2.8.2 Cyclovoltammetrie

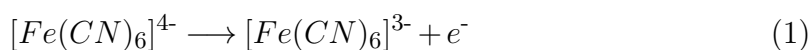
Zur elektrochemischen Bestimmung der elektroaktiven Oberfläche der mit elektrisch leitfähigen, magnetischen Nanopartikeln erweiterten Anodenoberfläche wurden Cyclovoltammetrien (CV) durchgeführt. Bei dieser Methode wird das Potential an der Arbeitselektrode linear verändert und die zugehörige Stromstärke gemessen. Sobald die vorgesehenen Potentialgrenzwerte erreicht sind, wird die Richtung der Potentialänderung jeweils umgekehrt. In der Regel wird dies für drei Zyklen wiederholt und aus dem resultierenden Voltammogramm lassen sich elektrochemische Eigenschaften der Elektrolyten oder der Elektroden bestimmen.

Tab. 13: **Zusammensetzung der Elektrolytlösung.**

<i>Substanz</i>	<i>g l⁻¹</i>	<i>M</i>
K ₄ [Fe(CN) ₆]	16,463	0,005
KOH	56,11	1
Mit ddH ₂ O auf 1000 ml auffüllen.		

Um die elektroaktive Oberfläche zu ermitteln, wurden zunächst die funktionalisierten Nanopartikel (Abschnitt 2.6) unter abiotischen Bedingungen durch den Inokulationsport in die bioelektrochemische Mikrofluidikplattform (Abschnitt 2.7) eingebracht und mit einem Magneten (10 x 10 x 1,2 mm) auf der Anodenfläche lokalisiert. Anschließend erfolgte ein Austausch der Inokulationslösung durch den Elektrolyten (Tabelle 13), gefolgt von einer zweistündigen Äquilibration. Ab diesem Schritt wurde im Dunkeln gearbeitet, um eine Zersetzung des Elektrolyten unter Bildung von Eisen(III)-hydroxid (Fe(OH)₃) zu verhindern.

Die Oxidationsreaktion der Hexacyanidoferrate an der Arbeitselektrode lautet wie folgt:



Die Reaktion ist diffusionskontrolliert durch die Hexacyanidoferrat-Ionen und weist eine gute Reversibilität mit Graphitelektroden auf (McCreery, 2008). Dies bedeutet, dass das Strommaximum (engl.: *peak current*, I_p) direkt proportional zur elektroaktiven Oberfläche der Arbeitselektrode ist, was durch die Randles-Sevcik-Gleichung zum Ausdruck gebracht werden kann (Zhu und Zhao, 2019):

$$I_p = 268600n^{\frac{3}{2}}AD^{\frac{1}{2}}C\nu^{\frac{1}{2}} \quad (2)$$

I_p [A] repräsentiert hierbei das Strommaximum, n steht für die Anzahl der im Redoxevent transferierten Elektronen (hier $n = 1$), A [cm²] ist die elektroaktive Oberfläche, D [cm² s⁻¹] ist der Diffusionskoeffizient (6×10^{-6} für [Fe(CN)⁶]⁴⁻; (Smith *et al.*, 2015)), C [mol cm⁻³] ist die Konzentration der redoxaktiven Spezies (hier 5×10^{-6} für [Fe(CN)⁶]⁴⁻) und ν [V s⁻¹] stellt die Vorschubgeschwindigkeit des Potentials dar (hier $\nu = 0,01$ V s⁻¹).

Darüber hinaus wurden cyclovoltammetrische Messungen eingesetzt, um zu ermitteln, ob die durch biogene Synthese mittels *S. oneidensis* erzeugten FeS-*Shewanella*-Hybride magnetische und redoxaktive Eigenschaften aufweisen. Hierzu wurde, wie in Abbildung 6 schematisch dargestellt, vorgegangen. Zunächst wurde *S. oneidensis* mit einer OD₆₀₀ von 2 im Medium zur biogenen Synthese der FeS-NPs (Tabelle 11) für 24 h bei 30 °C und 180 rpm inkubiert (a). Es konnte ein Farbumschlag der Suspension zu einer schwarzen Färbung beobachtet werden (b). Anschließend wurden 100 µl der Suspension in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und mit einer magnetischen Trennvorrichtung gewaschen (c). Hierzu wurde nach Platzieren des Gefäßes in der Trennvorrichtung zunächst 15 min inkubiert und anschließend der Überstand vorsichtig mit einer Pipette entfernt. Die magnetischen FeS-*Shewanella*-

Hybride wurden so durch den Magneten immobilisiert (d). Daraufhin wurde der magnetische Niederschlag in 20 μl anoxischem PBS (Tabelle 14) resuspendiert. 10 μl der magnetischen Suspension wurden vorsichtig auf eine Dickfilmelektrode aus Graphit (Metrohm Deutschland GmbH & Co. KG, Filderstadt) pipettiert, welche zusätzlich mit einem Magneten hinter der Arbeitselektrode ausgestattet wurde, um die magnetischen Hybride erneut zu immobilisieren (e). Die Dickfilmelektrode wurde in einer dafür vorgesehenen Messzelle mit 1 ml anoxischem PBS platziert und die cyclovoltammetrische Messung wurde durchgeführt (f). Die Messung erfolgte in einem Bereich von - 0,5 V bis + 0,5 V mit einer Vorschubgeschwindigkeit des Potentials von 0,1 V s⁻¹. Im Fall der Kontrollmessung nach 0 h Inkubationszeit wurde direkt nach der Inokulation 100 μl der Suspension in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und mit einer magnetischen Trennvorrichtung gewaschen.

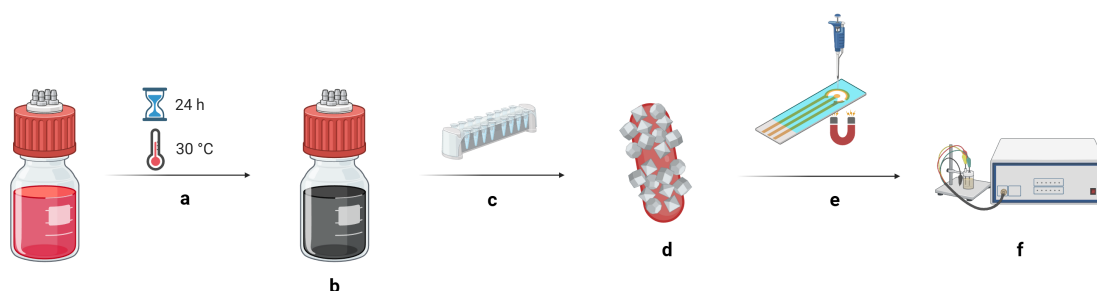


Abb. 6: **Schematische Darstellung des Vorgehens zur cyclovoltammetrischen Analyse der magnetischen FeS-*Shewanella*-Hybride.** *S. oneidensis* wurde für 24 h im Medium zur biogenen Synthese von FeS-NPs inkubiert (a). Die Bildung der NPs ist durch eine schwarze Färbung der Suspension erkennbar (b). Die Suspension wurde mit Hilfe einer magnetischen Trennvorrichtung gewaschen (c), um die magnetischen FeS-*Shewanella*-Hybride zu immobilisieren (d). Die erhaltene Suspension konnte daraufhin auf eine Dickfilmelektrode mit Magnet hinter der Arbeitselektrode pipettiert (e) und eine cyclovoltammetrische Messung durchgeführt werden (f).

2.8.3 Herstellung der Referenzelektroden

Die Ag/AgCl(-Pseudo)-Referenzelektroden der bioelektrochemischen Mikrofluidikplattform wurden elektrochemisch hergestellt. Hierzu wurde die bisher bestehende Methode zur Herstellung jeweils einer Referenzelektrode (Klein *et al.*, 2024a) so erweitert, dass nun zeitgleich 16 Referenzelektroden produziert werden konnten (Abbildung 7). Um dies zu ermöglichen, wurde ein flacher PDMS-Zylinder (Durchmesser: 50 mm, Höhe: 10 mm) gegossen, welcher in gleichmäßigen Abständen entlang der Außenseite 16 kleine Aussparungen (Durchmesser: 0,7 mm) sowie mittig eine größere Aussparung (Durchmesser: 5 mm) aufwies. Auf den PDMS-Zylinder wurde anschließend eine Kupferfolie, mit denselben kleinen Aussparungen und einer größeren mittigen Aussparung, aufgebracht.

In diese wiederverwendbare Apparatur wurden 16 etwa 4 cm lange, in absolutem Ethanol gereinigte, Stücke Silberdraht (Durchmesser: 0,8 mm; ChemPur) in die dafür vorgesehenen Aussparungen gesetzt, so dass sie nach unten etwa 2,5 cm überstanden. Das obere Ende der Drähte wurde jeweils durch Silberleitlack mit der Kupferfolie elektrisch konnektiert. In die mittige Aussparung wurde eine kommerziell erhältliche Ag/AgCl-Referenzelektrode eingesetzt. Dieser Aufbau wurde daraufhin in ein Becherglas mit 0,1 M entgaster Salzsäure und einem, an der inneren Wandung entlang gewundenen, Silberdraht getaucht. Die Oberfläche des Becherglases wurde mit Stickstoff gespült. Anschließend wurde an die Kupferfolie (und damit an die 16 Silberdrahtstücke, welche in diesem Aufbau als Arbeitselektrode fungierten) das notwendige Potential angelegt. Der gewundene Silberdraht diente als Gegenelektrode. Bei diesem Aufbau muss beachtet werden, dass die Kupferfolie keinen direkten Kontakt mit der Salzsäure aufweist sowie kein direkter Kontakt zwischen Arbeits- und Gegenelektrode besteht.

Zur Äquibrierung des elektrochemischen Systems wurde zunächst für 5 min Leerlaufspannung (engl.: *open circuit potential*, OCP) und anschließend für 50 min eine Spannung von 50 mV gegen die Leerlaufspannung angelegt. Die so hergestellten Ag/AgCl(-Pseudo)-Referenzelektroden wurden getrocknet und bis zur Verwendung in der bioelektrochemischen Mikrofluidikplattform dunkel und trocken aufbewahrt. Für jeden Anodenreaktor wurde jeweils eine neu hergestellte Referenzelektrode eingesetzt.

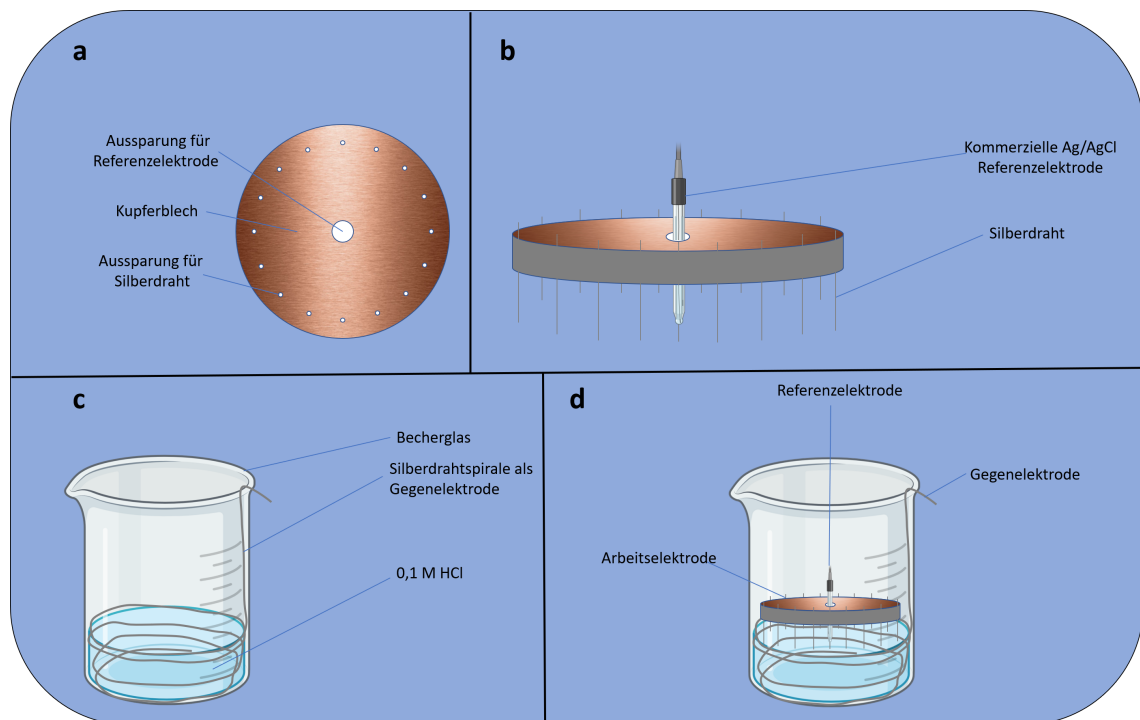


Abb. 7: **Aufbau der Apparatur zur simultanen Herstellung von 16 Referenzelektroden.** In **a** und **b** ist die Apparatur in Draufsicht bzw. Seitenansicht dargestellt. Diese Apparatur wird in einem modifizierten Becherglas (**c**) mit einer Silberspirale als Gegenelektrode platziert. Die elektrische Konnektierung eines Potentiostaten erfolgt wie in **d** dargestellt.

2.9 Bildgebende Verfahren

2.9.1 Optische Kohärenztomographie

Die optische Kohärenztomographie (engl.: *optical coherence tomography*, OCT) stammt ursprünglich aus der medizinischen Diagnostik. Sie wurde zunächst in der Ophthalmologie (Augenheilkunde) zur Erzeugung von 2D- und 3D-Abbildungen im menschlichen Auge eingesetzt (Fercher *et al.*, 1988), kann aber prinzipiell auch zur Bildgebung in fast allen streuenden Materialien wie biologischem Gewebe oder Biofilmen verwendet werden. Das Verfahren ist analog zur Sonographie (Ultraschallbildung), allerdings wird statt Schall Licht eingesetzt, was durch die kürzere Wellenlänge eine höhere Auflösung in der Bildgebung ermöglicht. Es handelt sich hierbei um eine zerstörungsfreie Echtzeit-Messmethode.

Zur OCT wurde ein GanymedeTM-Spektraldomänensystem (GAN611C1-SP1, Thorlabs, Dachau) eingesetzt, welches Infrarotlicht einer zentralen Wellenlänge von 930 nm (Bandbreite: 100 nm) nutzt. Dies ermöglicht eine verhältnismäßig hohe Eindringtiefe von etwa 2 mm in das zu untersuchende Material, bei einer axialen Auflösung von 5,5 μm .

In dieser Arbeit wurde mittels OCT in erster Linie die Assemblierung abiotischer und biotischer Mikrostrukturen auf Elektrodenoberflächen, welche durch Lokalisation magnetischer Nanopartikel in einem Magnetfeld ermöglicht wurde, mesoskopisch untersucht. Messparameter wurden nach Bauer *et al.* (2019) eingestellt und die Datensets anschließend mit (Fiji Is Just) ImageJ Version 2.1.0/1.53 (Schindelin *et al.*, 2012) prozessiert. Höhenprofile der mit magnetischen Nanopartikeln strukturierten Elektrodenoberflächen wurden basierend auf der Prozessroutine von Wagner und

Horn (2017) generiert. Oberflächenbedeckung und mittlere Höhe der abiotisch erzeugten anodischen Mikrostrukturen wurden aus diesen Höhenprofilen bestimmt. Um ihren mittleren Durchmesser zu ermitteln, wurden die Durchmesser von 100 Mikrosäulen via (Fiji Is Just) ImageJ gemessen. Aus den Informationen über Oberflächenbedeckung, mittleren Durchmesser und mittlere Höhe konnte anschließend die aktive Elektrodenoberfläche der magnetisch erzeugten mikrostrukturierten 3D-Anode berechnet werden. Hierbei wurde zur Näherung angenommen, dass es sich bei den Mikrosäulen um zylindrische Körper handelt.

2.9.2 Fluoreszenzmikroskopie

Da Nanopartikel potentiell cytotoxische Eigenschaften aufweisen (Ameen *et al.*, 2021), wurde mit Zell-Nanopartikel-Agglomeraten eine Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung (Lebend-Tot-Färbung), gefolgt von fluoreszenzmikroskopischer Analyse durchgeführt. Hierzu wurden 1,5 µl Propidiumiodid (20 mM in DMSO; Invitrogen AG, Carlsbad CA, USA) sowie 1 µl SYTO9 (5 mM in ddH₂O; Invitrogen AG, Carlsbad CA, USA) in 1 ml frisch hergestellte Zell-Nanopartikel-Suspension in Minimalmedium (Abschnitt 2.6) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 20 min im Dunkeln inkubiert und alle folgenden Schritte wurden ebenfalls unter Lichtausschluss ausgeführt. Das Mikroreaktionsgefäß wurde in eine dafür vorgesehene magnetische Trennvorrichtung

Tab. 14: Zusammensetzung der phosphatgepufferten Salzlösung (PBS, 10X).

<i>Substanz</i>	<i>g l⁻¹</i>	<i>mM</i>
NaCl	80	1368,93
KCl	2	26,83
Na ₂ HPO ₄	14,4	101,44
KH ₂ PO ₄	2,4	17,64

platziert und zweimal mit je 1 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, Tabelle 14) gewaschen, um überschüssige Färbelösung sowie ungebundene Zellen zu entfernen. 10 μ l der erhaltenen Suspension wurden auf einen Objektträger transferiert und mit einem Deckglas abgedeckt. Anschließend wurden licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mit einem Leica DM5500B Mikroskop, ausgestattet mit Leica K5-14401820 Kamera und Leica Application Suite X Software Version 3.8.0.26413 (Leica Microsystems, Wetzlar) erstellt. Die Bilder der Zell-Nanopartikel-Agglomerate wurden mit dem N PLAN 100x/1.25 Ölimmersionsobjektiv (Leica Microsystems, Wetzlar) aufgenommen.

Zur Bestimmung der Cytotoxizität der NPs gegenüber den eingesetzten Kulturen von *S. oneidensis* und *G. sulfurreducens* wurde die Anzahl der Zellen mit intakter äußerer Membran (lebend) mit der Anzahl der Zellen mit beschädigter äußerer Membran (tot) auf den NP-Agglomeraten verglichen. Das Verhältnis von lebenden zu toten Zellen wurde über Bildauswertung mittels (Fiji Is Just) ImageJ Version 2.1.0/1.53 ermittelt (Schindelin *et al.*, 2012). Hierzu wurden die aufgenommenen Bilder in ein 8-bit-Format konvertiert, mit einem angemessenen Schwellenwert (0 - 255) binarisiert und schlussendlich der Anteil lebender und toter Zellen über die folgenden Formeln errechnet:

$$A_{lebend} = \frac{\sum Pixel_{lebend}}{\sum Pixel_{lebend} + \sum Pixel_{tot}} \times 100 \quad (3)$$

$$A_{tot} = \frac{\sum Pixel_{tot}}{\sum Pixel_{tot} + \sum Pixel_{lebend}} \times 100 \quad (4)$$

2.9.3 Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie (REM; engl.: *scanning electron microscopy*, SEM) ist ein Verfahren, bei dem die Wechselwirkung eines Elektronenstrahls mit der zu untersuchenden Probe dazu genutzt wird, eine Abbildung der Probe zu erzeugen. Als Elektronenquelle dient in der Regel eine Wolfram-Glühkathode.

Das Auflösungsvermögen eines Mikroskops liegt etwa in der Größenordnung der Wellenlänge des verwendeten Strahls. Aufgrund der deutlich kleineren Wellenlänge des verwendeten Elektronenstrahls im Vergleich zu sichtbarem Licht ergibt sich eine erheblich höhere Auflösung der Rasterelektronenmikroskope im Vergleich zu Lichtmikroskopen. Moderne REM weisen eine Auflösungsgrenze von etwa 1,0 nm auf. Die Auflösungsgrenze eines klassischen Lichtmikroskops liegt bei etwa 200 nm. Das SEM nutzt zur Bildgebung vor allem Rückstreuielektronen und Sekundärelektronen (Abbildung 8), wobei erstere durch elastische und letztere durch inelastische Streuung von Primärelektronen entstehen. Bei der SEM wird die Probe zur Bildgebung abgerastert. Das bedeutet, dass der Bildbereich in einem bestimmten Muster abgefahren wird und je nach Signalstärke jedem Bildpunkt ein bestimmter Grauton zugeordnet wird. In dieser Arbeit wurde ein Zeiss Supra 55 VP REM verwendet.

Zur Probenvorbereitung wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen: Nach 40 h anodischer Kultivierung in der bioelektrochemischen Mikrofluidikplattform wurde ein *G. sulfurreducens*-Biofilm mit inkorporierten NPs zunächst im Anodenreaktor mit 4 % Formaldehyd in PBS (Tabelle 14) fixiert. Hierzu wurde die Fixierlösung unter kontinuierlichen Durchflussbedingungen von 4 ml h⁻¹ für 1 h durch den Reaktor gepumpt, gefolgt von einer schrittweisen Entsalzung mit absolutem Ethanol. Daraufhin wurde die Anode mit darauf befindlichem Biofilm-NP-Hybrid vorsichtig mit einem Skalpell aus dem Reaktor gehebelt und sofort in einen Hochdruck-Autoklaven

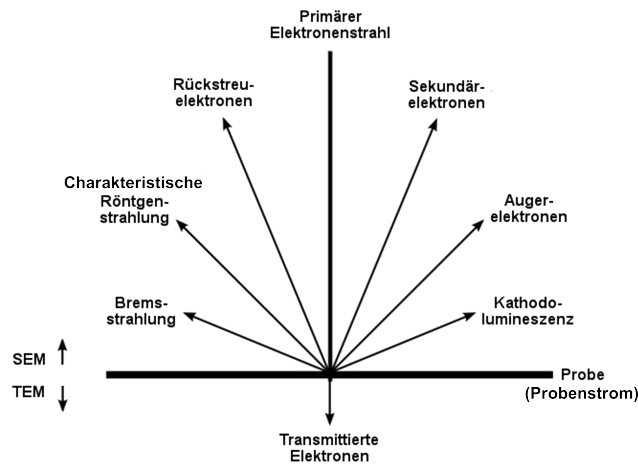


Abb. 8: **Mögliche Wechselwirkung von Elektronen mit Materie.** Modifizierte Reproduktion nach Williams und Carter (2009).

zur überkritischen Trocknung mit CO_2 überführt. Die Trocknung erfolgte bei $40\text{ }^\circ\text{C}$ und 120 bar für 1 h, wobei ein konstanter CO_2 -Strom (Flussrate: $80 - 110\text{ g min}^{-1}$) gewährleistet wurde. Die getrocknete Probe wurde, nach sanftem Druckausgleich, in einem Exsikkator verschlossen gelagert und vor der REM-Analyse mit Gold besputtert.

2.9.4 Energiedispersive Röntgenspektroskopie

Die Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX) ist eine spektroskopische Analysemethode zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der Elementzusammensetzung einer Probe. Sie kann in bestehende Elektronenmikroskope integriert werden.

Ein Atom kann unter Beschuss eines Primärelektronenstrahls bei inelastischer

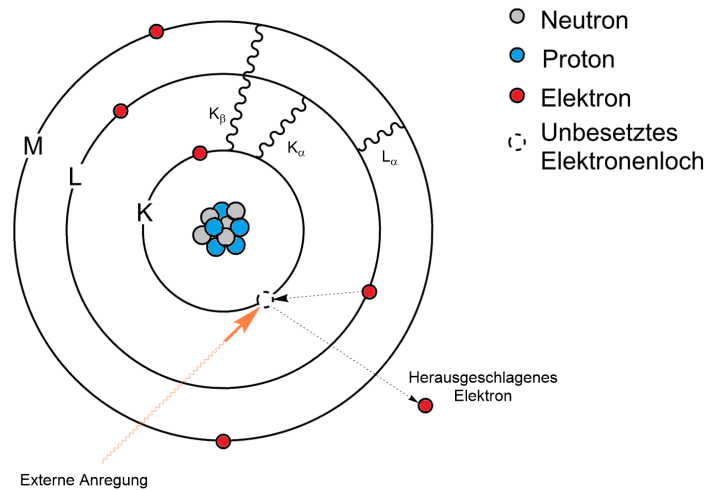


Abb. 9: Schematische Darstellung der Entstehung von charakteristischer Röntgenstrahlung.

Streuung der Probe ionisiert werden. Es wird also ein Elektron aus dem Atom herausgeschlagen. Falls dieses eine kernnahe Schale besetzt hat, befindet sich das Atom nun in einem instabilen Zustand. Deshalb fällt ein Elektron aus einer äußeren Schale in die innere und füllt das so entstandene „Loch“ auf. Dabei wird Energie frei, welche entweder in Form von Röntgenstrahlung abgegeben wird, oder durch Übertragung an ein anderes Elektron, wobei ein sogenanntes Augerelektron gebildet wird. Dieser Vorgang ist in Abbildung 9 schematisch dargestellt. Je höher die Ordnungszahl eines Atoms, desto seltener ist die Bildung von Augerelektronen. Somit sind schwerere Elemente besser zur EDX-Messung geeignet als leichte (Smart und Moore, 1997). Die frei werdende Röntgenstrahlung ist die Differenz von zwei definierten Energieniveaus und deshalb charakteristisch für jedes Element (West, 1999).

Röntgenstrahlung entsteht zudem als Bremsstrahlung bei elastischer Streuung des Primärstrahls an einer Probe. Dies führt zur Entstehung eines kontinuierlichen Untergrundspektrums. Der EDX-Detektor registriert Röntgenquanten, zählt deren Anzahl und misst deren Energie.

Die Benennung der Linien der Übergänge ist abhängig von der Schale, aus der das

Elektron entfernt wurde (K, L, M,...) und aus welcher Schale das andere Elektron in die innere Schale fällt: α bezeichnet einen Übergang aus der nächsthöheren Schale, β einen Übergang aus der Übernächsten, usw. Mit der Ordnungszahl nimmt die Energie der Serien (K, L, M,...) zu.

EDX-Untersuchungen wurden an dem bereits oben erwähnten REM Supra 55 VP der Firma Zeiss mit einem 80 mm² großem Silizium Drift EDX-Detektor der Firma Oxford Instruments durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Assemblierung einer dynamischen 3D-Elektrode

Zur Bildung dynamischer dreidimensionaler, leitfähiger Strukturen auf einer flachen Elektrodenfläche wurden magnetische NPs mit einem Eisenkern und einer hydrophoben Kohlenstoffhülle als Bausteine gewählt (Abbildung 10). Die Kohlenstoffhülle bietet den Vorteil chemischer Inertheit bei gleichzeitiger elektrischer Leitfähigkeit. Die hydrophobe Natur der Partikel erforderte jedoch eine passende Oberflächenfunktionalisierung, um eine kontrollierte Dispersion in wässrigen Medien zu ermöglichen. Hierzu wurde das amphiphile Polymer PEDOT:PSS eingesetzt, was darüber hinaus biokompatibel sowie elektrisch leitfähig ist (Střiteský *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2023; Salar-Garcia *et al.*, 2020; Zajdel *et al.*, 2018; Tseng *et al.*, 2022). Der Eisenkern ermöglicht den kontrollierten Aufbau dreidimensionaler Strukturen auf einer frei wählbaren Oberfläche, da sich die NPs nur entlang der Feldlinien eines extern angelegten Magnetfeldes anordnen.

Zur Ermittlung der Ausmaße der dadurch vergrößerten Elektrodenfläche wurde die NP-Suspension über einen Zeitraum von 2 h mit einer Flussrate von 2 ml h^{-1} in die bioelektrochemische Mikrofluidikplattform injiziert, welche mit Neodym-N52-Blockmagneten unter den Anoden ausgestattet wurde (vergleiche Abbildung 5b). Die injizierten NPs wurden durch das Magnetfeld angezogen, was zur Bildung von mikrostrukturierten Säulen auf der gesamten Anodenoberfläche führte (ergänzendes Video 1; Link siehe Anhang). Im Anschluss wurde die Elektrodenoberfläche mittels OCT gescannt und ein Höhenprofil erstellt (Abbildung 10a). Die Bedeckung der Oberfläche durch die Mikrosäulen wurde anhand dieser Höhenkarte bestimmt, wobei

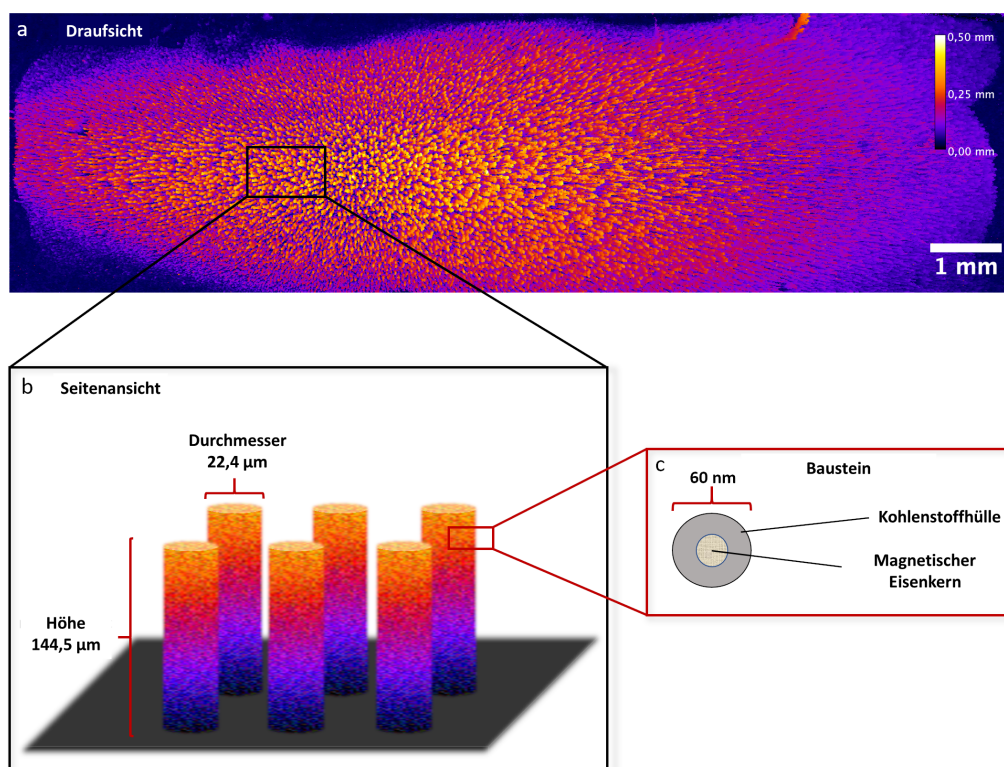


Abb. 10: Höhenprofil (a) und schematische Darstellung der leitfähigen, magnetischen Mikrosäulen (b) auf der Anodenoberfläche und die zugehörigen Nanopartikel-Bausteine (c). Das Höhenprofil (a) zeigt die Anodenoberfläche mit den darauf assemblierten Mikrosäulen, welche sich entlang der Magnetfeldlinien ausrichten in Draufsicht. Die Aufnahme wurde durch OCT-Messung und anschließende Bildbearbeitung mittels Fiji (Is Just ImageJ) generiert. Eine schematische Darstellung (b) zeigt einige Mikrosäulen auf der Anode im Seitenprofil sowie ihre mittlere Höhe und mittleren Durchmesser. Die schematische Darstellung ist aus Gründen der Übersicht vereinfacht dargestellt und zeigt deshalb eine höhere Regelmäßigkeit als das Höhenprofil. Die einzelnen NP-Bausteine der Mikrosäulen sind in c ebenfalls schematisch dargestellt. Sie tragen einen magnetischen Eisenkern und eine hydrophobe Kohlenstoffhülle.

sich ein Wert von 42,5 % der Gesamtoberfläche ergab. Die Höhenkarte wurde zudem zur Bestimmung der mittleren Höhe und des mittleren Durchmessers der Mikrosäulen herangezogen, was in einer Höhe von $144,5 \pm 82,4 \mu\text{m}$ und einem Durchmesser von $22,4 \pm 6,6 \mu\text{m}$ resultierte (siehe Abbildung 10b für eine schematische Darstellung). Mit diesen Werten war es möglich, die mittlere elektroaktive Gesamtoberfläche der Elektrode zu bestimmen. Unter der Annahme einer zylindrischen Form der einzelnen Säulen ergab sich daraus ein Wert von $3,6 \text{ cm}^2$ bzw. eine Vergrößerung der

Elektrodenfläche um den Faktor 12.

3.2 Disassemblierung der 3D-Elektrode

Nach erfolgreicher Assemblierung der magnetischen Mikrosäulen auf der Anodenoberfläche wurde versucht, eine kontrollierte Bewegung der NPs innerhalb des Reaktors zu ermöglichen. Zu diesem Zweck wurde eine bewegliche Magnethalterung entwickelt, die es ermöglichte, den Magneten unterhalb der Anode in der anoxischen Kammer des BES zu bewegen (ergänzendes Video 2; Link siehe Anhang). Zunächst wurden die Mikrosäulen aufgebaut, wobei der Magnet wie zuvor beschrieben unterhalb der Anode positioniert wurde. Dann wurde der Magnet stromabwärts von der Anode wegbewegt, soweit es die Positionierung innerhalb des Rahmens zuließ. Die magnetischen Nanopartikel bewegten sich nur geringfügig, selbst wenn der Magnet mehrmals hin und her bewegt wurde (ergänzendes Video 3; Link siehe Anhang). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass eine größere anoxische Kammer erforderlich wäre, um größere Permanentmagnete weiter von der Anode zu entfernen und so eine signifikante Bewegung der Nanopartikel zu ermöglichen.

Dennoch wurde ein alternativer Ansatz verfolgt, um die Möglichkeit der Disassemblierung der Strukturen zu demonstrieren. Zu diesem Zweck wurde ein zweiter, stärkerer Magnet (Neodym-N42-Blockmagnet; $10 \times 10 \times 5$ mm) gegenüber des ersten Magneten, mit dem die Mikrosäulen zunächst zusammengesetzt wurden, auf der Oberseite des Mikrofluidikkanals positioniert (ergänzendes Video 4; Link siehe Anhang). Sobald der zweite Magnet platziert wurde, konnte OCT nicht mehr zur Bildgebung verwendet werden, da der obere Magnet eine Beobachtung des Geschehens verhinderte. Dementsprechend konnten nur die Bilddaten vor Platzierung und nach

Entfernung des oberen Magneten zur Analyse verwendet werden. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass die NPs nach der Entfernung des oberen Magneten zurück auf die Anodenoberfläche gezogen wurden und sich dort erneut zu mikrostrukturierten Säulen reorganisierten. Dieser Ansatz demonstriert nicht nur die Lokalisation der NPs auf der Anodenoberfläche, sondern auch die Fähigkeit, sie von der Oberfläche wieder weg- und zurückzubewegen. Allerdings ist hierfür ein direkter Zugang zum Anodenreaktor ohne den Rahmendeckel erforderlich (vergleiche Abbildung 5), da der Abstand des oberen Magneten zur Anode sonst zu groß wäre. Diese Einschränkung verhindert die Verwendung des derzeitigen Aufbaus für biotische Experimente, da das Fehlen eines Deckels die Gewährleistung einer anoxischen Umgebung unmöglich macht. Aus diesem Grund wurde die Entscheidung getroffen, weitere Experimente mit einem nicht beweglichen Permanentmagneten durchzuführen, um kontrollierte Bedingungen zu schaffen.

3.3 Elektrochemische Analyse der 3D-Elektrode

Neben der grafischen Analyse mittels OCT wurde auch eine elektrochemische Analyse der mikrostrukturierten Anodenoberfläche durchgeführt. Zunächst wurde hierzu ein CV der unbehandelten 2D-Anodenoberfläche durchgeführt, was ein Strommaximum I_p von $0,094 \pm 0,001$ A ergab. Im Anschluss wurde die 3D-Anode mit magnetischen Mikrosäulen assembliert und eine weitere CV durchgeführt, was ein Strommaximum I_p von $0,19 \pm 0,0045$ A zur Folge hatte (Abbildung 11a). Die ermittelten Strommaxima können zur Berechnung der elektroaktiven Oberfläche, mithilfe der Randles-Sevcik-Gleichung, herangezogen werden, wobei ein Wert von $0,29 \pm 0,0022$ cm² für die elektroaktive Oberfläche der unbehandelten Anode bzw. $0,56 \pm 0,0065$ cm² für die mikrostrukturierte 3D-Anode (Abbildung 11b) ermittelt werden konnte. Dies

lässt darauf schließen, dass die durch magnetische NPs gebildeten Mikrosäulen die elektroaktive Oberfläche mindestens um den Faktor 2 vergrößern.

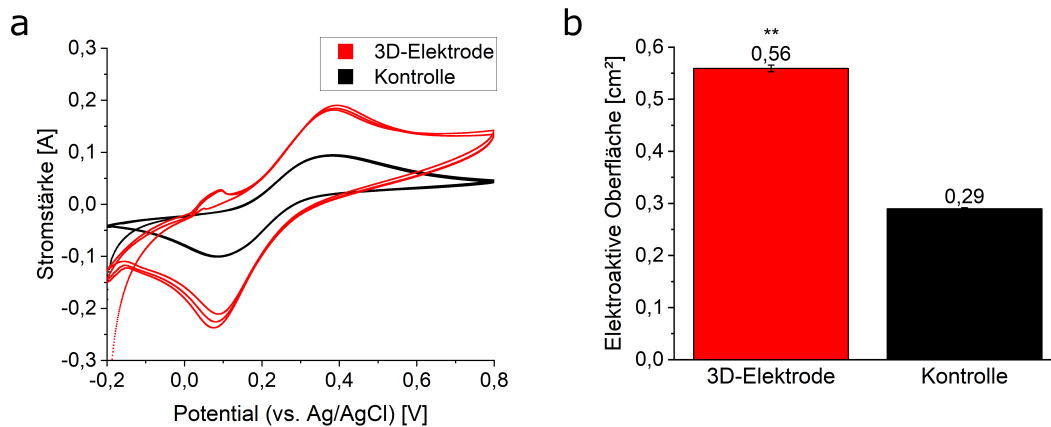


Abb. 11: **Elektrochemische Analyse der anodischen Oberflächenerweiterung.** Cyclovoltammetrie der unbehandelten Elektrode (schwarz) und der mikrostrukturierten 3D-Elektrode (rot, **a**). Die erhaltenen Strommaxima I_p ermöglichen die Berechnung der elektroaktiven Elektrodenoberfläche durch die Randles-Sevcik-Gleichung (**b**). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von I_p aus drei CV-Zyklen. Die Sternchen zeigen signifikante Unterschiede zur Kontrolle an (ungepaarter t -Test: ** = $p < 0,01$).

3.4 Viabilitätsassays elektroaktiver Zellen auf Nanopartikel-Aggregaten

Nach erfolgreicher Erweiterung der elektroaktiven Anodenoberfläche mit leitfähigen, magnetischen Mikrosäulen wurden die NPs auf ihre Eignung als Träger für die elektroaktiven Modellorganismen *S. oneidensis* und *G. sulfurreducens* untersucht. Dazu wurde ein Zellviabilitätstest durchgeführt, um mögliche zytotoxische Effekte der NPs qualitativ und quantitativ zu beobachten. Wie in Abbildung 12 zu sehen ist, scheinen die Partikel keine schwerwiegenden negativen Auswirkungen auf die Lebensfähigkeit der Zellen zu haben, da bei *G. sulfurreducens* $90 \pm 3 \%$ und bei *S. oneidensis* $79 \pm 11 \%$ der an die NP-Agglomerate gebundenen Zellen leben. Außerdem wurden Wachstumskurven von *S. oneidensis* in Gegenwart und Abwesenheit

von PEDOT:PSS-funktionalisierten NPs im Nährmedium erstellt. Die Experimente zeigten keine signifikanten Unterschiede im Wachstumsverhalten mit μ_{\max} -Werten von $0,24 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ für *S. oneidensis* ohne NPs bzw. $0,23 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$ für *S. oneidensis* mit NPs (Abbildung A1, Experimente wurden in Quadruplikaten durchgeführt, ungepaarter *t*-Test: $p > 0,5$). Die NPs eignen sich daher nicht nur als konduktive Erweiterung der Elektrodenoberfläche in abiotischen Versuchen, sondern auch für die Anwendung in BES. Darüber hinaus können die NP-Aggregate als steuerbares Trägermaterial fungieren, um Zellen an einem gewünschten Ort, z. B. einer Anode, zu lokalisieren, ohne das Zellwachstum zu behindern.

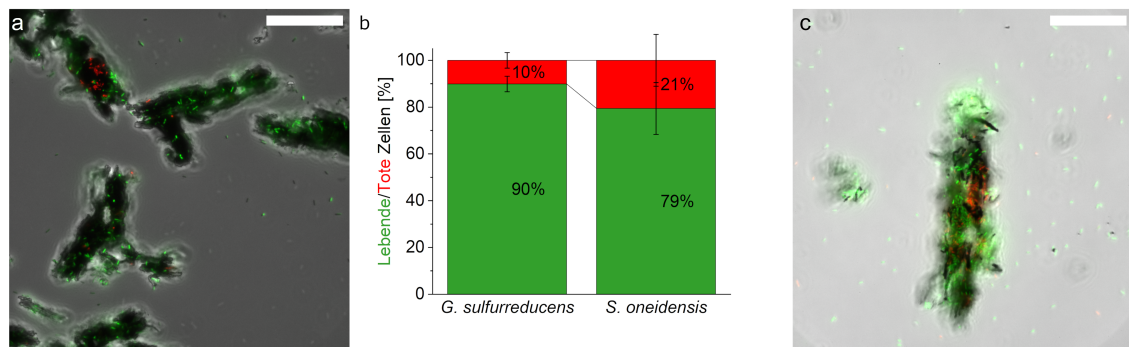


Abb. 12: Viabilitätsassays von *G. sulfurreducens* (a) und *S. oneidensis* (b) auf magnetischen, leitfähigen Nanopartikel-Aggregaten. b zeigt die relative Verteilung lebender und toter Zellen, während a und c mikroskopische Aufnahmen der lebenden (grün) und toten (rot) Zellen darstellen. Der weiße Balken in a und c weist eine Länge von 20 μm auf. Die Fehlerbalken in b repräsentieren die Standardabweichung technischer Triplikate.

3.5 Magnetische Nanopartikel optimieren die BES-Performance

Die Verwendung von NP-Aggregaten als steuerbares Trägermaterial in BES wurde mit den elektroaktiven Modellorganismen *S. oneidensis* und *G. sulfurreducens* getestet. In beiden Fällen wurde die NP-Suspension direkt vor der Inokulation zur

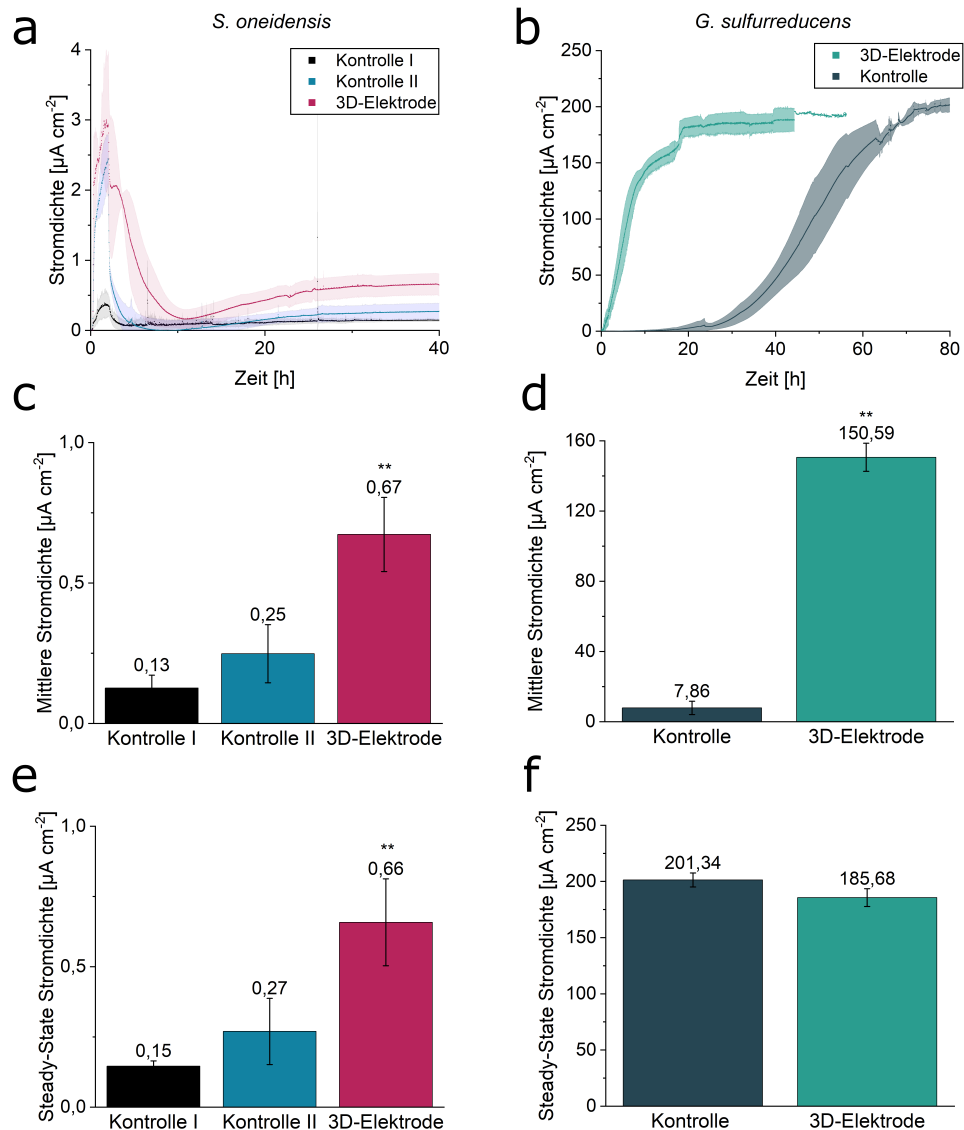


Abb. 13: Vergleich der Stromdichten mit und ohne Zugabe magnetischer, leitfähiger NPs für *S. oneidensis* und *G. sulfurreducens*. In den Feldern a, c und e sind die Stromdichten für *S. oneidensis* für drei Bedingungen dargestellt: ohne NP-Zugabe (Kontrolle I), mit NP-Zugabe, aber ohne einen Magneten unter der Anode (Kontrolle II), und mit NP-Zugabe und einem unter der Anode platzierten Magneten (3D-Elektrode). In den Feldern b, d und f sind die Stromdichten für *G. sulfurreducens* unter zwei Bedingungen dargestellt: ohne NP-Zugabe (Kontrolle) und mit NP-Zugabe und einem Magneten unterhalb der Anode (3D-Elektrode). a und b zeigen die Stromdichte von *S. oneidensis* bzw. *G. sulfurreducens* über die Zeit. In c und d sind die mittleren Stromdichten der beiden Mikroorganismen nach 40 h aufgetragen, während e und f die Stromdichten im Steady-State zeigen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von Triplikaten und im Falle der Kontrolle II von Duplikaten dar. Sternchen stehen für signifikante Unterschiede zu Kontrolle I bzw. Kontrolle (ungepaarter *t*-Test: ** = $p < 0,01$).

Zellsuspension gegeben. Zunächst wurde die erzeugte Stromdichte von *S. oneidensis* ohne Zugabe von Nanopartikeln (Kontrolle I) mit der Stromdichte von *S. oneidensis* mit zugesetzten Nanopartikeln, jedoch ohne einen unter der Anode positionierten Magneten (Kontrolle II), verglichen. Zusätzlich wurde auch mit einem Experiment verglichen, bei dem sowohl Nanopartikel zugesetzt wurden als auch ein Magnet vorhanden war (Abbildung 13a, c, e).

Die Stromdichte mit der mikrostrukturierten 3D-Anode war während des gesamten Experiments (40 h) höher als die Kontrollen, wobei die Steady-State-Stromdichte im Vergleich zur Kontrolle I (mit klassischer zweidimensionaler Anode) durchweg signifikant höher war. Die mittlere Stromdichte betrug $0,67 \pm 0,13 \mu\text{A cm}^{-2}$ verglichen mit einer mittleren Stromdichte von $0,13 \pm 0,046 \mu\text{A cm}^{-2}$ für das Experiment der Kontrolle I, bzw. $0,25 \pm 0,10 \mu\text{A cm}^{-2}$ für Kontrolle II. Die Zugabe von NPs ohne Magnet unter der Anode scheint also schon eine leicht positive Auswirkung auf die mittlere Stromdichte zu haben, jedoch ist die Erhöhung nicht signifikant (ungepaarter *t*-Test: $p > 0,1$).

Bemerkenswert ist auch, dass bei *S. oneidensis* die maximale Stromdichte bereits direkt am Ende der Inokulation erreicht wird (2 h, Abbildung 13a). Da *S. oneidensis* ein eher schlechter anodischer Biofilmbildner ist und vergleichsweise geringe Stromdichten erreicht, stammt dieser Peak höchstwahrscheinlich von den durchgespülten planktonischen Zellen, die auf die Anode als Elektronensenke angewiesen sind. Mit der Zeit werden die planktonischen Zellen jedoch mit dem Medienstrom ausgewaschen. Die komplexere dreidimensionale mikrostrukturierte Anode scheint die planktonischen Zellen länger zurückzuhalten als die 2D-Anode der Kontrollversuche. Dies führt dazu, dass mehr planktonische Zellen die Anode über einen längeren Zeitraum als Elektronensenke nutzen können. Schließlich werden nach etwa 10 h auch die

planktonischen Zellen von der 3D-Anode ausgewaschen und von diesem Zeitpunkt an bleiben die verbleibenden an der Anode haftenden Zellen übrig, um Elektronen auf die Elektrode zu übertragen und einen Biofilm zu bilden.

Ein anderes Verhalten wurde bei *G. sulfurreducens* beobachtet. Hier führten die Mikrosäulen nicht zu einer signifikanten Veränderung der Steady-State-Stromdichte (ungepaarter *t*-Test: $p > 0,05$), die Anlaufzeit wurde jedoch drastisch verkürzt, sodass die Plateauphase bereits nach 18 h, verglichen mit 72 h im Kontrollexperiment, erreicht wurde. Es wurde also eine 4-fache Verkürzung der Anlaufzeit erreicht. Dies hat auch einen signifikanten Einfluss auf die mittlere Stromdichte nach 40 h, wo die mikrostrukturierte Anode Werte von $150,59 \pm 8,02 \mu\text{A cm}^{-2}$ erreichte, verglichen mit einer mittleren Stromdichte von $7,86 \pm 3,77 \mu\text{A cm}^{-2}$ im Kontrollexperiment (Abbildung 13b, d, f).

In Abbildung 14 sind darüber hinaus REM-Aufnahmen eines *G. sulfurreducens*-Biofilms präsentiert, welcher auf einer mikrostrukturierten 3D-Anode gewachsen ist. Es ist anzunehmen, dass die für die Elektronenmikroskopie erforderliche Präparation der Probe die Struktur des Biofilms beeinflusst hat, jedoch ist die Bedeckung einer in der Abbildung hervorgehobenen Mikrosäule durch den Biofilm (gelb) deutlich erkennbar. Es lassen sich lediglich vereinzelte Bereiche ohne Bedeckung (magenta) ausmachen, was darauf hindeutet, dass die Zellen zur Bildung von Biofilmen entlang der gesamten Mikrosäulenstrukturen befähigt sind.

Darüber hinaus konnte über eine EDX-Analyse bestätigt werden, dass die Mikrosäulen tatsächlich aus den eingesetzten NP-Bausteinen mit Eisenkern und Kohlenstoffhülle bestehen (Abbildung A2).

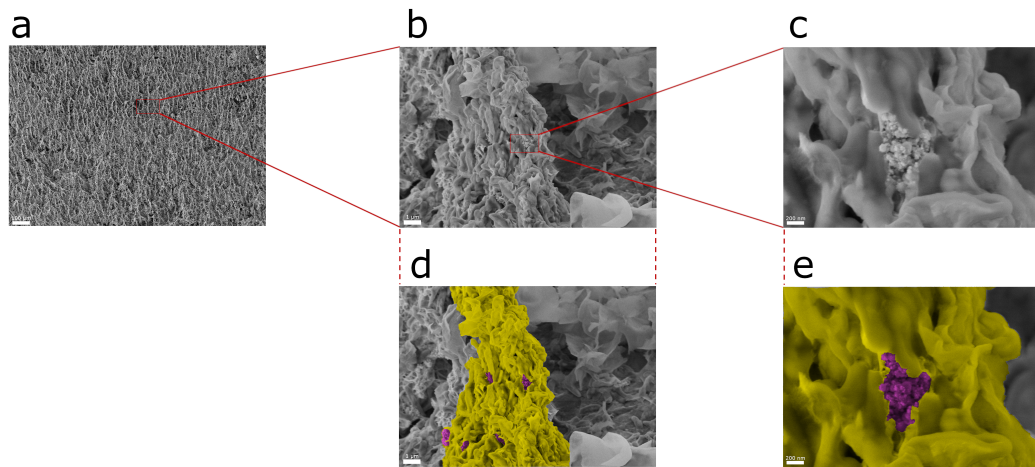


Abb. 14: **REM-Aufnahme eines mikrostrukturierten anodischen *G. sulfurreducens*-Biofilms.** Übersichtsaufnahme mit einer Vielzahl an Mikrosäulen (a), Zoom auf eine Mikrosäule (b, d) und weiterer Zoom auf einige NP-Bausteine, die nicht von Biofilm bedeckt sind (c, e). Der größte Teil der Mikrosäulen ist mit Biofilm bedeckt und es sind auch einzelne *G. sulfurreducens*-Zellen erkennbar. Zur besseren Sichtbarkeit wurde in d und e die Biofilm-Matrix auf der Mikrosäule gelb und die NPs magenta eingefärbt.

3.6 Kombination mit PEDOT:PSS-Aggregaten sorgt für weiter gesteigerte *S. oneidensis*-Performance in BES

Um zu untersuchen, ob die von *S. oneidensis* produzierte Stromdichte durch eine weitere Vergrößerung der leitfähigen Oberfläche verbessert werden kann, wurde ein Gemisch aus leitfähigen magnetischen NPs, PEDOT:PSS-Aggregaten und Zellsuspension direkt vor Inokulation in das BES frisch hergestellt. Die PEDOT:PSS-Aggregate, welche sich in Gegenwart von Fumarat im Vorkulturmedium bilden, sollten als synthetische, leitfähige Biofilm-Matrix für *S. oneidensis*, welche sich in den Mikrostrukturen auf der Anodenoberfläche verfangen konnten, dienen.

Wie in Abbildung 15a und b gezeigt wird, war die produzierte Stromdichte im Vergleich zum Experiment, bei dem dem Inokulum nur PEDOT:PSS-Aggregate und keine

NPs zugesetzt wurden, deutlich erhöht. Die mittlere Stromdichte erreichte nach 40 h $3,58 \pm 0,91 \mu\text{A cm}^{-2}$, verglichen mit $0,16 \pm 0,037 \mu\text{A cm}^{-2}$ im Kontrollexperiment.

Bei näherer Betrachtung des Optimierungsfaktors für die Steady-State-Stromdichte (Abbildung 15c) zeigt sich, dass sowohl die Zugabe von NPs ohne Magnet unter der Anode (II) als auch die Zugabe von PEDOT:PSS-Aggregaten ohne NPs (III) keinen signifikanten Einfluss haben, während die Zugabe von magnetischen, leitfähigen NPs und die anschließende Bildung von Mikrosäulen auf der Anodenoberfläche (Abbildung 15c-IV) die Steady-State-Stromdichte um den Faktor $4,52 \pm 1,06$ deutlich verbessert. Die Kombination von PEDOT:PSS-Aggregaten und magnetischen, leitfähigen Mikrosäulen führt zu einem noch höheren signifikanten Optimierungsfaktor von $21,89 \pm 7,41$ (Abbildung 15c-V).

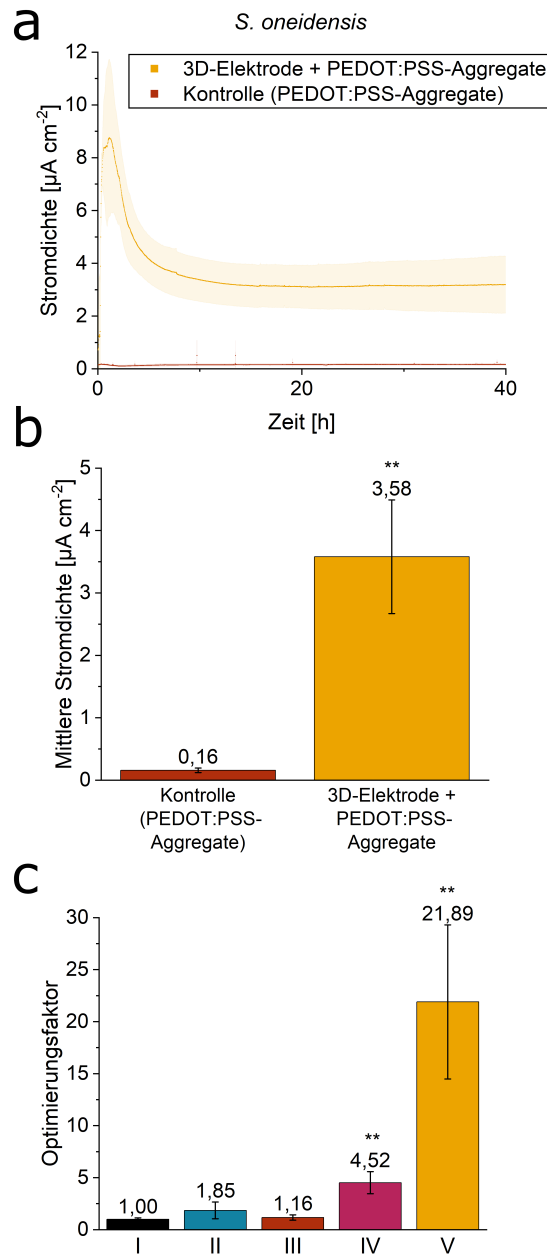


Abb. 15: **Kombination der magnetischen, leitfähigen NPs mit PEDOT:PSS-Aggregaten sorgt für weiter gesteigerte *S. oneidensis*-Performance in BES.** **a** zeigt die Stromdichte über die Zeit für den Fall, dass nur PEDOT:PSS-Aggregate zugegeben werden sowie für den Fall der Zugabe einer Kombination aus magnetischen, leitfähigen NPs und PEDOT:PSS-Aggregaten. In **b** sind die entsprechenden mittleren Stromdichten nach 40 h zu sehen. Zusätzlich sind die Optimierungsfaktoren der Steady-State Stromdichte im Vergleich zu Kontrolle I (keine NP-Zugabe; I) für Kontrolle II (NP-Zugabe ohne Magnet; II), für die Zugabe von nur PEDOT:PSS-Aggregaten (keine NP-Zugabe; III), für die Zugabe von nur magnetischen, leitfähigen Nanopartikeln (IV) und für die Kombination von Nanopartikeln und PEDOT:PSS-Aggregaten (V) dargestellt (**c**). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von Triplikaten und für Kontrolle II von Duplikaten. Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede im Vergleich zum Experiment der Kontrolle I (ungepaarter *t*-Test: ** = $p < 0,01$).

3.7 Untersuchung des Einflusses von durch *S. oneidensis* biosynthetisierten FeS-NPs auf die BES-Performance

Nach den erfolgreichen Versuchen zur Optimierung der Performance von *S. oneidensis* und *G. sulfurreducens* in BES mittels extern zugegebener kommerziell erhältlicher magnetischer NPs, sollte in einem nächsten Schritt untersucht werden, ob es darüber hinaus auch möglich ist, *Shewanella* selbst zur Synthese magnetischer NPs zu nutzen und diese im BES einzusetzen. Hierzu sollte die bereits bekannte Fähigkeit zur Reduktion metallischer Vorstufen unter Bildung von NPs durch *S. oneidensis* genutzt werden (vergleiche Abschnitt 1.2.1).

Als *proof of principle* wurde die Bildung von FeS-NPs gewählt. Diese Partikel weisen nach nasschemischer Synthese superparamagnetische Eigenschaften auf (Malek *et al.*, 2018), sollten sich also grundsätzlich zur geplanten Anwendung eignen. Darüber hinaus ist bereits eine Syntheseroute von FeS-NPs durch *S. oneidensis*-gestützte Reduktion von FeCl_3 und $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ bekannt (Fu *et al.*, 2021; Dang *et al.*, 2021; Yu *et al.*, 2020). Hierzu müssen die beiden Edukte als einzige Elektronenakzeptoren im Medium vorliegen und nach etwa 24 h Inkubationszeit sind sie vollständig zu FeS-NPs umgesetzt. In der Literatur ist darüber hinaus beschrieben, dass die FeS-NPs im Periplasma und in der äußeren Membran lokalisiert sind und den Elektronentransfer verbessern sollen, was bereits unter anderem zu besseren Umsatzraten bei der Reduktion von Cr(VI) zu Cr(III) oder besserer Performance (in Kombination mit anderen Optimierungen) im BES führte (Fu *et al.*, 2021; Yu *et al.*, 2020). Hierbei wurde bisher jedoch nicht auf die potentiellen magnetischen Eigenschaften der NP-Mikroorganismus-Hybride eingegangen. Diese Wissenslücke sollte im Rahmen dieser Arbeit gefüllt werden.

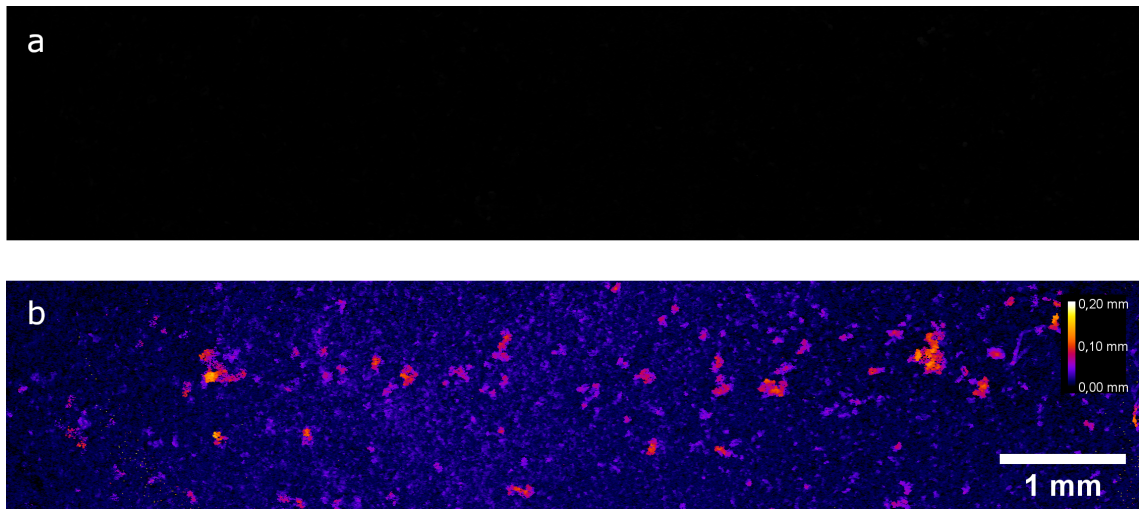
3.7.1 FeS-*Shewanella*-Hybride weisen magnetische Eigenschaften auf

Abb. 16: **Höhenprofile der mit einem schwächeren (a) und stärkeren (b) Magneten auf der Anodenoberfläche assemblierten FeS-NPs.** Das obere Höhenprofil (a) zeigt die Anodenoberfläche, jedoch keine darauf assemblierten Mikrostrukturen. Unter der Anode war hier ein NdFeB-Permanentmagnet mit einer Größe von 10 x 10 x 1,2 mm platziert. Das untere Höhenprofil (b) zeigt die Anodenoberfläche mit darauf assemblierten Mikrostrukturen. Unter der Anode war hier ein NdFeB-Permanentmagnet mit einer Größe von 10 x 10 x 5 mm platziert.

Zur biogenen Synthese magnetischer FeS-NPs durch *S. oneidensis* wurde das in Tabelle 11 beschriebene Kulturmedium genutzt. Das Medium wurde mit einer OD_{600} von 2 beimpft und für 24 h bei 30 °C und 180 rpm inkubiert. Die Bildung von FeS-NPs war erkennbar durch eine tiefschwarze Färbung des Mediums. Um die erzeugten Partikel auf ihre magnetischen Eigenschaften zu untersuchen, wurden sie in die bioelektrochemische Mikrofluidikplattform für 2 h mit einer Flussrate von 2 ml h^{-1} injiziert. Unter der Anode wurde entweder ein NdFeB-Permanentmagnet mit einer Größe von 10 x 10 x 1,2 mm (Abbildung 16a), wie er auch in den vorausgegangenen Experimenten mit den kommerziell erhältlichen NPs bisher eingesetzt wurde, oder ein stärkerer Magnet mit einer Größe von 10 x 10 x 5 mm (Abbildung 16b) platziert. Nach vollendeter Injektion wurden die Elektrodenoberflächen mittels OCT analysiert, um zu untersuchen, ob eine Assemblierung von FeS-*Shewanella*-Hybriden innerhalb

des Magnetfelds stattgefunden hat.

Aus Abbildung 16b wird ersichtlich, dass es generell möglich ist, die FeS-*Shewanella*-Hybride mit einem geeigneten Magneten auf der Anode zu immobilisieren. Jedoch scheint ihr Magnetismus schwächer ausgeprägt zu sein als bei den in den vorausgegangenen Experimenten eingesetzten kommerziell erhältlichen magnetischen NPs. Dementsprechend wird zur Lokalisation auf der Anode ein stärkerer Magnet benötigt, welcher deshalb in den folgenden Experimenten weiterhin eingesetzt wurde. Des Weiteren erscheint die dynamische Anodenerweiterung weniger gleichmäßig strukturiert und weniger Raum einnehmend als beim Einsatz der kommerziell erhältlichen NPs.

Darüber hinaus wurde eine elektrochemische Analyse der immobilisierten magnetischen FeS-*Shewanella*-Hybride durchgeführt, um zu ermitteln, ob diese auch redoxaktiv sind (vergleiche Abschnitt 2.8.2; Abbildung 17). Nach 24-stündiger Inkubation im Medium zur Synthese biogener FeS-NPs (Tabelle 11; Abbildung 17, schwarz) ist ein klarer wiederkehrender Reduktionspeak bei etwa - 350 mV (vs. Ag/AgCl) zu erkennen, wobei der zugehörige Oxidationspeak nicht klar zuzuordnen ist, vermutlich jedoch im Bereich von etwa 300 mV liegt. Beim Kontrollexperiment wurde die elektrochemische Analyse direkt nach Inokulation der Zellen in das Medium zur Synthese biogener FeS-NPs durchgeführt (Abbildung 17, rot). In diesem Fall ist keine magnetische redoxaktive Spezies detektierbar. Die initialen Leermessungen der beiden Dickfilmelektroden können in Abbildung A3 eingesehen werden.

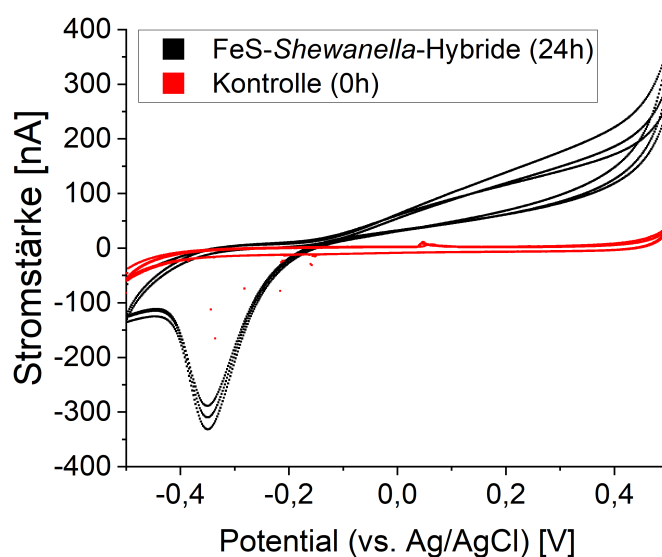


Abb. 17: **Elektrochemische Analyse der FeS-*Shewanella*-Hybride.** Cyclovoltammetrie der mit einem Magneten auf einer Dickfilmelektrode immobilisierten FeS-*Shewanella*-Hybride nach 0 h (rot) bzw. 24 h (schwarz). Direkt nach Inokulation in das Medium zur Synthese biogener FeS-NPs liegen noch keine magnetischen Partikel im Medium vor (rot; Kontrolle (0 h)). Nach 24-stündiger Inkubationszeit können durch Cyclovoltammetrie jedoch mit dem Magneten immobilisierte redoxaktive Substanzen nachgewiesen werden (schwarz; FeS-*Shewanella*-Hybride (24 h)).

3.7.2 Zellviabilitätsassay der FeS-*Shewanella*-Hybride

Nachdem erfolgreich gezeigt werden konnte, dass auch die FeS-*Shewanella*-Hybride mithilfe eines Magneten auf der Anode als Erweiterung der elektroaktiven Oberfläche lokalisiert werden können, wurden die Hybride einem Zellviabilitätstest unterzogen, um eine etwaige Toxizität der FeS-NPs auf die Zellen zu eruieren. Wie in Abbildung 18 zu sehen ist, scheinen die Partikel keine negativen Auswirkungen auf die Lebensfähigkeit der Zellen zu haben, da kein Propidiumiodid-Signal (roter Kanal) zu erkennen ist. Außerdem wurde über ein Bradford-Assay die Gesamtproteinkonzentration und damit indirekt die Zellzahl vor und nach 24-stündiger Inkubation im Medium zur biogenen Synthese von FeS-NPs bestimmt, wobei keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden konnten (Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt, unge-

paarter t -Test: $p > 0,5$). Die Zellen bleiben also lebensfähig und die Zellzahl bleibt währenddessen nahezu konstant.

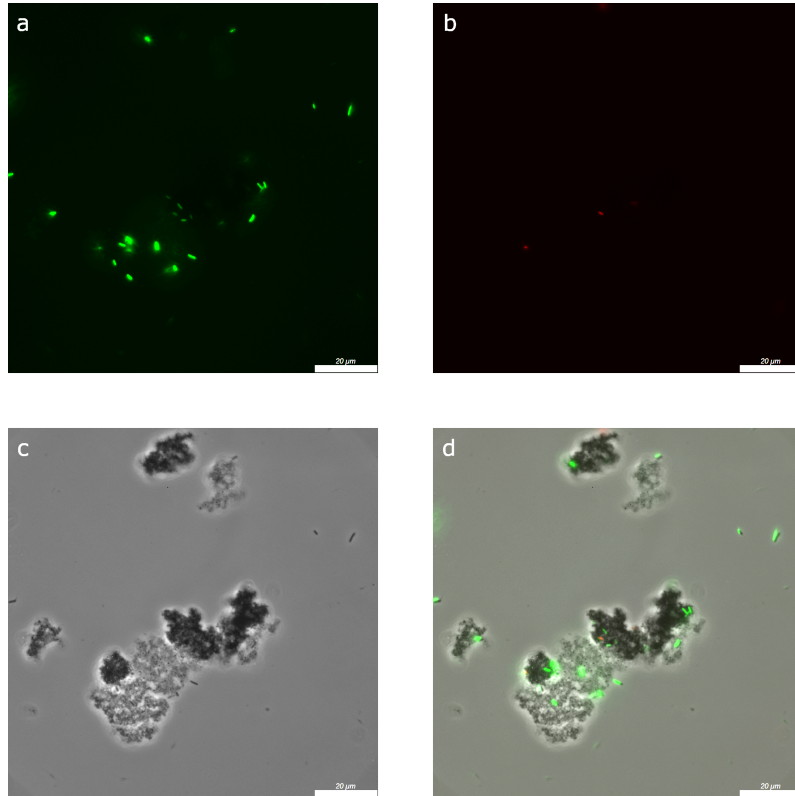


Abb. 18: **Viabilitätsassays der FeS-*Shewanella*-Hybride**. Mikroskopische Aufnahme der Zellen eingebettet in biogen synthetisierte magnetische Partikelagglomerate. **a** zeigt den grünen, **b** den roten und **c** den Phasenkontrast-Kanal, während in **d** das überlagerte Bild der drei Kanäle dargestellt ist. Der weiße Balken weist jeweils eine Länge von 20 μm auf. Die FeS-Biosynthese scheint keinen negativen Effekt auf die Zellviabilität zu haben.

3.7.3 FeS-*Shewanella*-Hybride verbessern BES-Performance

Schließlich sollte evaluiert werden, ob die magnetischen FeS-*Shewanella*-Hybride zudem einen positiven Einfluss auf die Stromdichte im BES haben. *S. oneidensis* wurde hierzu für 24 h mit einer OD_{600} von 2 im Medium zur biogenen Synthese der FeS-NPs inkubiert und anschließend direkt in die bioelektrochemische Mikrofluidikplattform inokuliert. Hierbei wurde einmal kein Magnet unter der Anode platziert (Kontrolle II) und einmal wurde ein starker Magnet unter der Anode platziert

(+ Magnet; Abbildung 19).

Die erzeugte Stromdichte wurde über 40 h gemessen und darüber hinaus mit *S. oneidensis* ohne Zugabe von Nanopartikeln (Kontrolle I, vergleiche Abschnitt 3.5) verglichen. Die Stromdichte der FeS-*Shewanella*-Hybride war mit und ohne Magnet während des gesamten Experiments höher als die des konventionellen *S. oneidensis*-Experiments (Kontrolle I). Die Steady-State-Stromdichte im Vergleich zur Kontrolle I (mit klassischer zweidimensionaler Anode) lag für Kontrolle II bei $0,25 \pm 0,05 \mu\text{A cm}^{-2}$ und war damit signifikant höher als bei Kontrolle I (ungepaarter *t*-Test: $p < 0,5$). Der Zusatz eines Magneten und die damit verbundene verbesserte Immobilisierung auf der Anode erhöhte die Steady-State-Stromdichte weiter signifikant auf einen Wert von $0,39 \pm 0,001 \mu\text{A cm}^{-2}$ (+ Magnet; ungepaarter *t*-Test: $p < 0,1$). Die mittlere Stromdichte betrug jeweils $0,22 \pm 0,03 \mu\text{A cm}^{-2}$ ohne Magnet bzw. $0,62 \pm 0,013 \mu\text{A cm}^{-2}$ mit Magnet. Auch in diesen Experimenten wurde die maximale Stromdichte von *S. oneidensis* bereits direkt am Ende der Inokulation erreicht (2 h, Abbildung 19a).

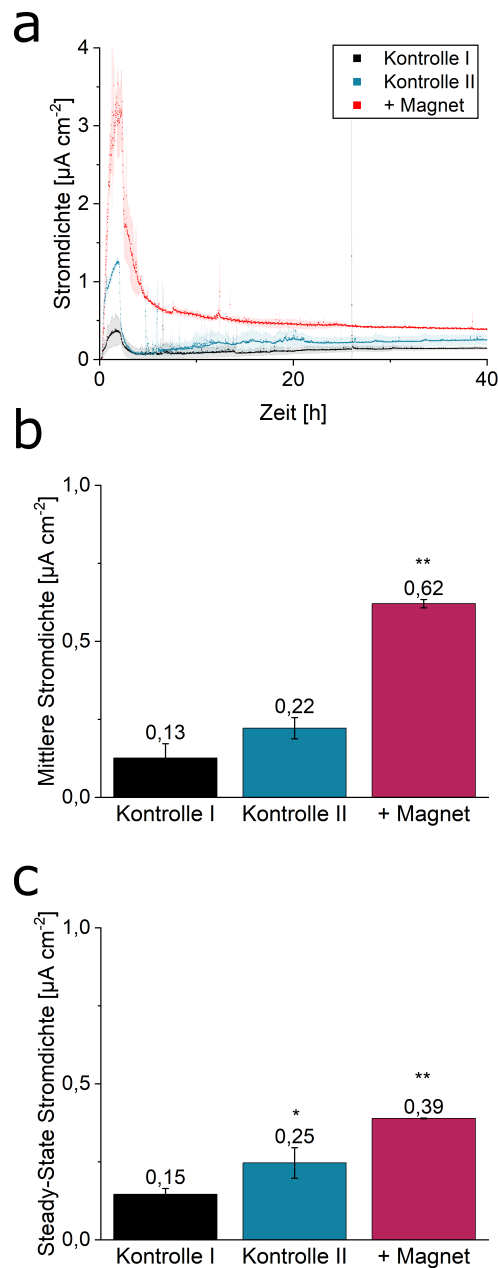


Abb. 19: Vergleich der Stromdichten der FeS-*Shewanella*-Hybride mit und ohne Einsatz eines Magneten. In den Feldern a, b und c sind die Stromdichten von *S. oneidensis* für drei Bedingungen dargestellt: ohne NPs (Kontrolle I, vergleiche Abschnitt 3.5), mit biogen synthetisierten FeS-NPs, aber ohne einen Magneten unter der Anode (Kontrolle II), und mit biogen synthetisierten FeS-NPs und einem unter der Anode platzierten Magneten (+ Magnet). a zeigt die Stromdichten von *S. oneidensis* über die Zeit. In b sind die mittleren Stromdichten nach 40 Stunden aufgetragen, während c die Stromdichten im Steady-State zeigen. Die Fehlerbalken stellen im Falle von Kontrolle I die Standardabweichung von Triplikaten und im Falle der FeS-*Shewanella*-Hybrid-Experimente von Duplikaten dar. Sternchen stehen für signifikante Unterschiede zu Kontrolle I (ungepaarter *t*-Test: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

4 Diskussion

4.1 Vergrößerung der elektroaktiven Elektrodenoberfläche mittels leitfähiger, magnetischer Nanopartikel

Wie aus Abbildung 10 ersichtlich wird, führt die Verwendung magnetischer, leitfähiger NPs als Bausteine zur Bildung von strukturierten Mikrosäulen zu einer Vergrößerung der anodischen Oberfläche. Die OCT-Analyse ergab eine Vergrößerung um etwa den Faktor 12 für die gewählten Versuchsbedingungen. Durch Anpassung von NP-Konzentration, Durchflussrate, Magnetfeld usw. können wahrscheinlich auch anders dimensionierte Strukturen auf der Anode assembliert werden. Zusätzlich wurde die mikrostrukturierte Elektrode elektrochemisch mittels CV untersucht und mit einer unbehandelten flachen Anodenoberfläche verglichen (Abbildung 11). Dieses Experiment ergab durch Berechnung über die Randles-Sevcik-Gleichung eine verdoppelte elektroaktive Oberfläche. Dies deutet zunächst darauf hin, dass die erzeugten Mikrosäulen tatsächlich elektrisch leitfähig sind und die verfügbare elektroaktive Oberfläche vergrößern. Wären die eingesetzten NPs nicht elektrisch mit der Anode verbunden, dann wäre eine geringere Stromdichte im Vergleich zum Kontrollexperiment zu erwarten, da die gebildeten Strukturen dann die Anodenoberfläche blockieren und damit die verfügbare Oberfläche verringern würden. Da das Gegenteil der Fall ist (höheres Strommaximum bei CV nach Ausbildung der 3D-Elektrode), kann davon ausgegangen werden, dass die NPs tatsächlich die elektroaktive Oberfläche vergrößern.

Der Unterschied in der mittels OCT und CV ermittelten Oberfläche könnte auf

mehrere Gründe zurückzuführen sein. Ein Faktor hierbei ist, dass bei der CV der beobachtete Strom durch die Diffusion des Elektrolyten zur Elektrode bestimmt wird, wodurch eine Diffusionsschicht um die Elektrodenoberfläche herum entsteht. Daher hat die CV bei der Analyse von 3D-Elektroden ihre Grenzen und misst hauptsächlich die Elektrodenfläche der Außenkontur dieser Diffusionsschicht und erfasst kleinere Hohlräume im Zentrum der Elektrodenstruktur nicht (Barnes *et al.*, 2014). Das bedeutet, dass die tatsächliche elektroaktive Oberfläche höchstwahrscheinlich größer ist, als durch CV ermittelt. Nichtsdestotrotz ist diese Technik nützlich, da sie eine qualitative Aussage über die Vergrößerung der elektroaktiven Oberfläche erlaubt. Außerdem ist es möglich, dass die mittels OCT-Analyse ermittelte Oberfläche nicht durchgängig elektroaktiv ist und dass es Mikrosäulenbereiche gibt, die mittels OCT messbar sind, aber nicht unbedingt elektrisch mit der Elektrode verbunden sein müssen. Insgesamt ist es schwierig, die vergrößerte elektroaktive Oberfläche genau zu bestimmen, aber die beiden Werte, die mittels OCT und CV ermittelt wurden, markieren wahrscheinlich die äußeren Grenzen der tatsächlichen Zunahme der elektroaktiven Oberfläche.

4.2 Magnetische Nanopartikel-Aggregate fungieren als steuerbares Trägermaterial für Mikroorganismen

Nach erfolgreicher abiotischer Assemblierung und Charakterisierung der dynamischen mikrostrukturierten 3D-Elektrode, wurden die NP-Agglomerate mittels eines Zellviabilitätstests mit den elektroaktiven Mikroorganismen *S. oneidensis* und *G. sulfurreducens* auf ihre Zytotoxizität untersucht. Beide Spezies haften spontan an den Agglomeraten und zeigen mit 79 % bzw. 90 % lebenden Zellen eine hohe

Lebensfähigkeit (Abbildung 12). Da die Partikel leitfähig und magnetisch sind und keine wesentliche Zytotoxizität aufweisen, eignen sie sich besonders gut als lenkbares Trägermaterial für elektroaktive Mikroorganismen. In dieser Studie war das Ziel die Anordnung auf einer Elektrode, jedoch könnten die Nanopartikel-Mikroorganismus-Hybride auf jede beliebige Oberfläche gelenkt werden, sodass eine schnelle und kontrollierte Bildung von (nicht notwendigerweise anodischen) Biofilmen an jedem gewünschten Ort möglich ist. Die einzige Voraussetzung ist das Vorhandensein eines Magnetfelds, entlang dessen Feldlinien sich die Agglomerate orientieren können, das heißt entweder muss ein Magnet hinter der zu behandelnden Oberfläche platziert werden oder die betreffende Oberfläche selbst muss magnetisch sein.

Die Ergebnisse aus den abiotischen Experimenten zur Disassemblierung der Mikrosäulen mit einem beweglichen Magneten oder einem zweiten Magneten zeigen deutlich, dass die Partikel nach ihrer anfänglichen Assemblierung bei Bedarf neu positioniert werden können. Jedoch wäre es sinnvoll, hierfür eine größere Infrastruktur rund um die bioelektrochemische Mikrofluidikplattform zu entwickeln, um entweder Elektromagneten, die ein- und ausgeschaltet werden können, oder größere Dauermagneten zu integrieren und so biotische Experimente zu ermöglichen, die bedeutendere strukturelle Veränderungen der Nanopartikelarchitektur beinhalten.

4.3 Mikrostrukturierte 3D-Elektrode optimiert elektroaktive Biofilme

Folglich wurden die Nanopartikel-Mikroorganismus-Hybride in die bioelektrochemische Mikrofluidikplattform inokuliert, um ihre Auswirkungen auf die Stromdichte-

produktion zu untersuchen. *S. oneidensis* ist dafür bekannt, lediglich vergleichsweise dünne Biofilme auf Anoden auszubilden (Klein *et al.*, 2024a; Kitayama *et al.*, 2017). Durch die Bildung der mikrostrukturierten 3D-Anodenoberfläche wurde der Organismus in seiner Fähigkeit, Strom zu produzieren, deutlich verbessert. Dies war jedoch nicht der Fall, wenn NPs ohne einen unter der Anode platzierten Magneten hinzugefügt wurden. Dies lässt den Schluss zu, dass nur eine Kombination aus magnetischen, leitfähigen NPs und einem extern angelegten Magnetfeld zu der fast 5-fachen Leistungssteigerung des Biofilms führt. Der Magnet ist als Verankerungs- und Strukturierungsmerkmal der dynamischen 3D-Elektrode, bestehend aus einzelnen, magnetischen, leitfähigen NPs, demnach unerlässlich. Unter der Annahme, dass die Organismen auch auf den leitfähigen Mikrosäulen lediglich einen dünnen Biofilm bilden können, steht die Verbesserung um etwa Faktor 5 im Einklang mit der ermittelten Vergrößerung der elektroaktiven Anodenoberfläche.

Um die begrenzte Fähigkeit der Organismen zur anodischen Biofilmbildung weiter zu überwinden, wurden PEDOT:PSS-Aggregate eingesetzt und zusammen mit NPs und *S. oneidensis* in die bioelektrochemische Mikrofluidikplattform inokuliert. PEDOT:PSS sollte als synthetische, leitfähige Biofilm-Matrix dienen und die Bakterien nicht nur direkt auf der Anoden- oder Mikrosäulenoberfläche, sondern auch innerhalb der PEDOT:PSS-Agglomerate, die in den Mikrosäulen verwoben wurden, beherbergen. Die magnetisch gesteuerte Bildung dieses dreidimensionalen halbsynthetischen Biofilms führte zu einem signifikanten Optimierungsfaktor der stationären Stromdichte von $21,89 \pm 7,41$ im Vergleich zur Kontrolle. Wurden dem *S. oneidensis*-Inokulum nur PEDOT:PSS-Aggregate zugesetzt, wurde keine signifikante Änderung der Steady-State-Stromdichte im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. Der Grund dafür ist wahrscheinlich, dass in dem Durchflusssystem zunächst kein Mechanismus vorhanden ist, um die PEDOT:PSS-Aggregate auf der

Anode zu halten. Die Kombination mit magnetisch leitfähigen NPs hingegen führt zu einem Einschluss von PEDOT:PSS-Aggregaten, die direkt mit der Anodenoberfläche verbunden sind und darauf immobilisiert werden.

Die Kombination beider Materialien führt dementsprechend zu einer weiteren Vergrößerung der elektroaktiven Oberfläche, wobei die PEDOT:PSS-Aggregate offenbar eine beträchtliche Menge an *S. oneidensis*-Zellen beherbergen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der von Zajdel *et al.* (2018) vorgestellten Arbeit, bei der ein mehrschichtiger Biofilm auf PEDOT:PSS-Basis auf einer Anode elektropolymerisiert wurde, was zu einer 20-fachen Erhöhung der Stromdichte führte.

In einer kürzlich veröffentlichten Studie erzielten Tseng *et al.* (2022) eine bis zu 178-fache Steigerung der Stromdichte mit einer komplexeren Oberflächenfunktionalisierung einer Indium-Zinn-Oxid-(ITO)-Elektrode, die zusätzlich zu PEDOT:PSS mit Poly(2-hydroxyethylacrylat) (PHEA) und einer Polydopaminschicht vernetzt war. Der Optimierungsfaktor ist nur schwer mit den Ergebnissen dieser Studie zu vergleichen, da ITO ein sehr glattes Material ist, das im Vergleich zu rauen Kohlenstoffelektroden die Bildung von Biofilmen generell erschwert und unterschiedliche Prozessparameter gewählt wurden. Es ist jedoch denkbar, dass dieselbe Beschichtung der in dieser Studie verwendeten NPs die erzeugte Stromdichte weiter erhöhen könnte, auch wenn dies eine komplexere Vorbehandlung der NPs erfordern würde.

Die in der hier vorliegenden Arbeit eingesetzten kleineren Bausteine bestehen aus magnetischen, leitfähigen NPs und vorpolymerisierten PEDOT:PSS-Aggregaten und bieten Potenzial für eine höhere Vielseitigkeit und Wiederverwendbarkeit in potentiellen Anwendungen, da es durch ihre modulare Anordnung möglich ist, die Materialien durch den Einsatz eines geeigneten Magnetfeldes zu entfernen, neu

anzuordnen und zurückzugewinnen. Die Aussicht auf magnetische halbsynthetische Biofilme, welche durch den Einsatz geeigneter, räumlich und zeitlich veränderlicher Magnetfelder in einem neuen Maß kontrollierbar werden, könnte zusätzlich dazu beitragen, vorherrschende Engpässe wie Substratlimitierungen durch eine gesteuerte Reorganisation der Mikroorganismus-NP-Hybride auf der Anodenoberfläche zu überwinden. Zukünftige Studien auf diesem Gebiet könnten sich auf solche abstimmbare Biofilme und ihre Auswirkungen auf die Produktivität konzentrieren.

Vergleichbar mit Kabelbakterien ist es ebenfalls denkbar, die Hybride aus *S. oneiden-sis* und leitfähigen, magnetischen NPs zum Elektronentransport über lange Distanzen zu nutzen und dadurch unabhängig von der Anwendung im BES Substratgradienten zu überwinden (Abbildung 20). Der Langstreckenelektronentransfer in Kabelbakterien wurde 2010 entdeckt und ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt (Nielsen *et al.*, 2010; Bjerg *et al.*, 2018). Es gilt jedoch als erwiesen, dass die Bakterien kabelartige Filamente von über einem Zentimeter Länge bilden. Innerhalb dieser Filamente teilen sich die individuellen Zellen ein gemeinsames Periplasma, welches elektrisch leitfähige Proteinfasern enthält (Boschker *et al.*, 2021). Diese ungewöhnliche Morphologie ermöglicht Kabelbakterien den Transport respiratorischer Elektronen über Zentimeter-Distanzen und befähigt sie zur Oxidation von Schwefelwasserstoff (H_2S) in anoxischem Sediment. Die zugehörige Reduktion findet hingegen räumlich getrennt im oxischen Sediment statt. Diese Eigenschaft ermöglicht theoretisch die Überwindung von Substratgradienten und ist dementsprechend interessant für die Anwendung in biotechnologischen Reaktoren (Xiong *et al.*, 2024). Kabelbakterien erweisen sich bisher jedoch als äußerst schwierig kultivierbar in Reinkultur, was die genetische Zugänglichkeit und generelle industrielle Anwendung folglich erheblich einschränkt (Thorup *et al.*, 2021).

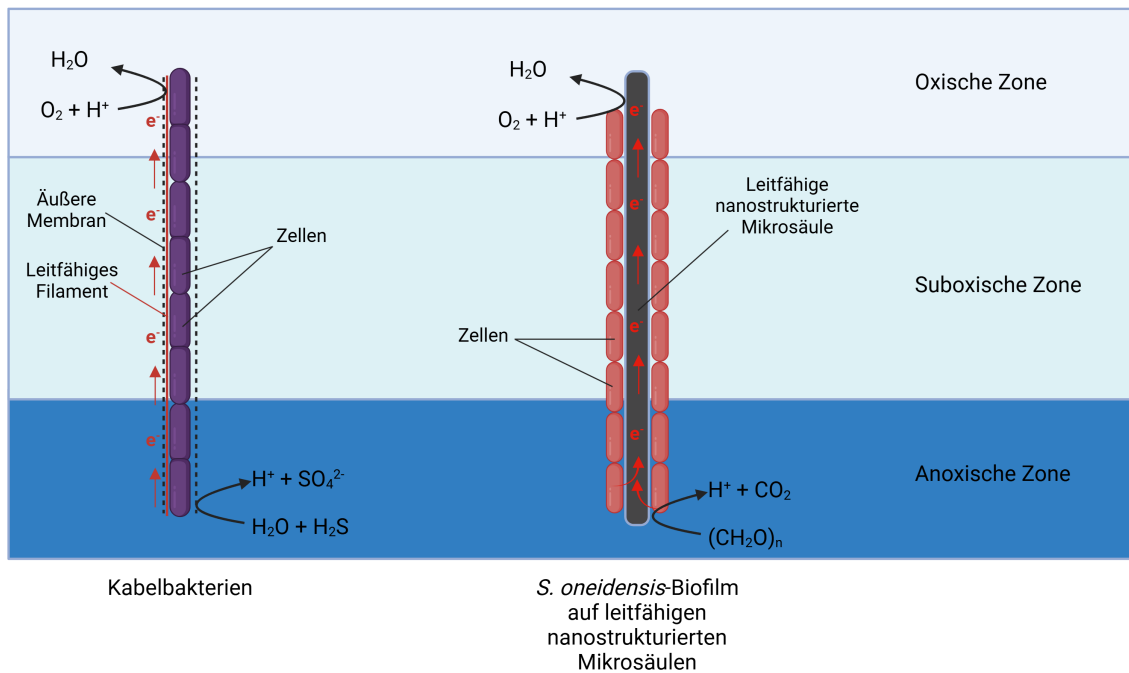


Abb. 20: **Schematische Darstellung zum Vergleich des Elektronentransfers über lange Distanzen bei Kabelbakterien und bei *S. oneidensis* mittels leitfähiger nanostrukturierter Mikrosäulen.** Kabelbakterien sind natürlicherweise befähigt, Elektronen mittels periplasmatischer leitfähiger Filamente über Zentimeter-Distanzen zu transportieren und so räumliche getrennte Redoxreaktionen zu ermöglichen. *S. oneidensis* kann durch den Einsatz extrazellulärer magnetischer, leitfähiger, nanostrukturierter Mikrosäulen ebenfalls dazu befähigt werden, Elektronen über längere Distanzen zu transportieren. Die Abbildung ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht maßstabsgetreu und soll den Mechanismus des Elektronentransfers schematisch darstellen.

Eine Alternative hierzu könnten *S. oneidensis*-Biofilme auf den in dieser Arbeit vorgestellten magnetischen, leitfähigen nanostrukturierten Mikrosäulen bieten. Natürlicherweise ist *S. oneidensis* nur zum direkten Elektronentransfer über kurze Strecken fähig. Durch die extrazelluläre Erweiterung der Elektronentransportkette konnten in dieser Arbeit vermutlich Langstreckentransporte in einem Maßstab von über 100 μm ermöglicht werden. Auch längere Entfernungen sind denkbar, müssten jedoch auf ihre Umsetzbarkeit untersucht werden. Die verbesserten Umsatzraten im BES sind bereits ein *proof of principle* des Elektronentransports über für *Shewanella* verhältnismäßig

lange Strecken. *S. oneidensis* als bereits gut erforschter, exoelektrogener, genetisch zugänglicher, fakultativ anaerober Organismus bietet sich als idealer Kandidat zur Erforschung und potentiellen Anwendung in produktiven Biofilmsystemen an.

Darüber hinaus konnte in Experimenten mit Kabelbakterien bereits gezeigt werden, dass sich in der anoxischen Zone rund um die Kabelbakterien eine Vielzahl anderer Bakterien konzentriert, welche vermutlich über Shuttle-Moleküle respiratorische Elektronen an die Kabelbakterien übertragen und so ebenfalls vom Langstrecken-elektronentransport profitieren (Bjerg *et al.*, 2023). Auch *S. oneidensis* scheint zum direkten Interspezies-Elektronentransfer befähigt und könnte somit in Mischkulturen als Drehscheibe für den Abtransport metabolisch anfallender Elektronen dienen (Dubé und Guiot, 2015; Klein *et al.*, 2024a).

Bei *G. sulfurreducens* führten die Mikrosäulenstrukturen auf der Anode hingegen nicht zu einer signifikanten Veränderung der Steady-State-Stromdichte im Vergleich zur Kontrolle. Bei *Geobacter* scheint die Anodenarchitektur keine entscheidende Rolle zu spielen, und die Oberflächenrauheit der Elektrode wirkt sich bei diesem Organismus kaum auf die Steady-State-Stromdichte aus. Eine Studie von Kipf *et al.* (2018), die sich mit verschiedenen Anodenmaterialien für *G. sulfurreducens* befasste, führte zu demselben Ergebnis. Andererseits wurde in einer Studie von Champigneux *et al.* (2018) eine Erhöhung der Stromdichte für *G. sulfurreducens* durch Nano-/Mikrostrukturierung von Goldelektroden mit Goldmikrosäulen von $100 \times 100 \mu\text{m}$ Querschnitt, $500 \mu\text{m}$ Höhe und einem Abstand von $100 - 200 \mu\text{m}$ erreicht. Dieser, im Vergleich zur vorliegenden Studie, größere Abstand ermöglichte eine bessere Substratdiffusion, die der begrenzende Faktor für die Verbesserung der Stromproduktion der dickeren *Geobacter*-Biofilme zu sein scheint. Daher scheinen weniger dicht gepackte Mikrosäulen für die Leistungsoptimierung dieses Organismus

von Vorteil zu sein, während bei *S. oneidensis* das Gegenteil der Fall zu sein scheint.

In den Experimenten mit *G. sulfurreducens* wurde die Steady-State-Stromdichte jedoch schon nach 18 h, im Vergleich zu 72 h in der Kontrolle, erreicht. Diese 4-fache Beschleunigung der Anlaufzeit ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die leitfähigen, magnetischen NPs als lenkbares Trägermaterial fungieren und aktiv mit einem Magneten auf die Anodenoberfläche gezogen werden können, was letztendlich zu einer erhöhten Anzahl von Mikroorganismen, die direkt nach der Inokulation auf der Anodenoberfläche immobilisiert werden, führt. Nach Champigneux *et al.* (2018) scheint auch die Aufrauung der Elektrodenoberfläche eine Rolle bei der Verkürzung der Anlaufzeit zu spielen. Diese erhebliche Verkürzung der Anlaufzeit ist besonders vorteilhaft für mögliche Anwendungen in der Verfahrenstechnik, wo Zeitverzögerungen zu einer geringeren Produktivität und damit zu einem Wertverlust im Prozess führen.

4.4 FeS-*Shewanella*-Hybride zeigen magnetische und elektroaktive Eigenschaften

In einer weiterführenden Studie sollte untersucht werden, ob statt extern zugegebener kommerziell erhältlicher magnetischer NPs auch durch *S. oneidensis* biogen synthetisierte NPs zur gezielten magnetischen Lokalisation auf einer Elektrode genutzt werden können. Hierzu wurde die bereits bekannte Fähigkeit des Organismus zur Bildung von FeS-NPs durch Reduktion der einzigen im Medium vorhandenen terminalen Elektronenakzeptoren FeCl_3 und $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ zurückgegriffen (Fu *et al.*, 2021; Dang *et al.*, 2021; Yu *et al.*, 2020). Die NPs werden sowohl intra- als auch extrazellulär

gebildet und befinden sich vorrangig auf der äußeren Membran. Obwohl diese Partikel superparamagnetische Eigenschaften aufweisen können (Malek *et al.*, 2018), wurde auf die Möglichkeit zur Manipulation der Organismen mittels Magnetfeldern bisher kein Wert gelegt. Um dies zu untersuchen, wurden die FeS-*Shewanella*-Hybride in die bioelektrochemische Mikrofluidikplattform inokuliert und unter der Anode wurden Magnete mit einer Größe von 10 x 10 x 1,2 mm bzw. 10 x 10 x 5 mm angebracht. Ersterer wurde auch in den vorausgegangenen Experimenten mit den kommerziell erhältlichen NPs eingesetzt, letzterer erzeugt ein stärkeres Magnetfeld. Die nach vollendeter Inokulation durchgeführte OCT-Analyse (Abbildung 16) ergab, dass es nur mit dem stärkeren Magneten möglich ist, die FeS-*Shewanella*-Hybride in signifikanter Zahl zu immobilisieren. Dies bedeutet zunächst, dass es grundsätzlich möglich ist, mit *S. oneidensis* aus ionischen Edukten magnetische NPs zu synthetisieren und diese auch gezielt zu lokalisieren. Die FeS-NPs weisen jedoch eine geringere Magnetisierbarkeit als die kommerziellen NPs mit Eisenkern und Kohlenstoffhülle auf. Diese Erkenntnis deckt sich mit den von Malek *et al.* (2018) ermittelten superparamagnetischen Eigenschaften der FeS-NPs.

Da die FeS-NPs vorrangig auf der äußeren Membran und im Periplasma gebildet werden (Fu *et al.*, 2021), kann davon ausgegangen werden, dass *S. oneidensis* dadurch selbst zumindest in starken Magnetfeldern ausgerichtet werden kann. Die Fähigkeit von Lebewesen, sich am Magnetfeld der Erde zu orientieren, wird auch als Magnetotaxis bezeichnet (Blakemore, 1975). Es ist denkbar, dass auch die FeS-*Shewanella*-Hybride durch die magnetischen Eigenschaften der FeS-NPs magnetotaktische Eigenschaften gewinnen, ohne dass die Organismen über die hierzu eigentlich notwendigen Magnetosomen, welche jeweils einen schwachen Permanentmagneten aus Magnetit (Fe_3O_4) oder Greigit (Fe_3S_4) enthalten, verfügen (Bazylnski *et al.*, 1994). Da die FeS-NPs jedoch lediglich superparamagnetisch sind, kommt die

Magnetotaxis vermutlich nur in stärkeren extern angelegten Magnetfeldern und nicht im Erdmagnetfeld zum Tragen. Zur Überprüfung dieser Hypothese könnte in zukünftigen Experimenten das Bewegungsverhalten der FeS-*Shewanella*-Hybride in Magnetfeldern untersucht werden.

Ein Vergleich der auf der Anode immobilisierten Mikrostrukturen aus FeS-*Shewanella*-Hybriden mit den aus den kommerziell erhältlichen NPs gebildeten Mikrosäulen (Abbildung 10a) macht außerdem deutlich, dass die FeS-*Shewanella*-Hybride weniger strukturiert und kleiner sind. Auch dies ist vermutlich auf die schwächere Magnetisierbarkeit der Partikel zurückzuführen.

Eine elektrochemische Analyse der immobilisierten magnetischen FeS-*Shewanella*-Hybride mittels Cyclovoltammetrie ergab außerdem einen klar erkennbaren, wiederkehrenden reduktiven Peak bei einem Potential von etwa - 350 mV (vs. Ag/AgCl; Abbildung 17). Dies deckt sich mit Literaturdaten zur CV von FeS-NPs, welche ebenfalls einen Reduktionspeak bei diesem Potential mit derselben Vorschubgeschwindigkeit feststellen konnten (Helz *et al.*, 2011).

4.5 FeS-NPs zeigen keine Cytotoxizität

Nachdem festgestellt wurde, dass auch durch *S. oneidensis* biosynthetisierte magnetische NPs zur Immobilisierung genutzt werden können, wurden die FeS-*Shewanella*-Hybride einem Zellviabilitätstest unterzogen, um potentielle cytotoxische Eigenschaften der intra- und extrazellulär gebildeten Partikel auf die Mikroorganismen zu ermitteln. Wie Abbildung 18 zu entnehmen ist, konnten keine negativen Auswirkungen auf die Viabilität festgestellt werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Yu

et al. (2020), wo ebenfalls FeS-*Shewanella*-Hybride erzeugt wurden, diese jedoch zuvor zusätzlich mit einer Polydopaminschicht funktionalisiert wurden. Auch in diesem Fall konnte kein negativer Einfluss auf die Zellviabilität festgestellt werden. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen außerdem, dass die Zellen in verhältnismäßig große Agglomerate von extrazellulären biosynthetisierten Partikeln eingebettet sind. Vermutlich ließe sich die Zahl der intrazellulär synthetisierten magnetischen NPs sowie ihre Größenverteilung durch Anpassung der Prozessparameter noch weiter optimieren (Dang *et al.*, 2021).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sich die Zellzahl nach 24-stündiger Inkubation im Medium zur biogenen Synthese der FeS-NPs nicht signifikant verändert hat.

4.6 FeS-*Shewanella*-Hybride verbessern die Performance im BES

Die Inokulation der FeS-*Shewanella*-Hybride in die bioelektrochemische Mikrofluidikplattform sollte schließlich Aufschluss darüber geben, ob durch die Ausbildung von FeS-NPs der Elektronentransfer auf eine Elektrode verbessert werden kann. Wie in Abbildung 19 gezeigt, resultiert schon die Inokulation der FeS-*Shewanella*-Hybride (Kontrolle II) in einer etwa 1,7-fachen signifikanten Erhöhung der Steady-State-Stromdichte, ohne dass ein Magnetfeld angelegt wurde. Dies lässt sich vermutlich durch einen verbesserten Elektronentransfer erklären, welcher durch die intrazellulär gebildeten FeS-NPs ermöglicht wurde. Fu *et al.* (2021) konnten durch Experimente mit Deletionsmutanten zeigen, dass die Kinetik der Reduktion von Cr(VI)-Spezies durch FeS-*Shewanella*-Hybride im Vergleich zum Wildtyp verbessert werden konnte und

dass die FeS-NPs wohl *c*-Typ-Cytochrome der Elektronentransportkette substituieren oder neue eigenständige Elektronentransportketten bilden können (Abbildung 21). Dementsprechend ist die erhöhte Stromdichte erwartbar und deckt sich mit bisherigen Erkenntnissen.

Eine Inokulation der FeS-*Shewanella*-Hybride mit zusätzlich unter der Anode positioniertem Magneten (+ Magnet) hatte eine weitere signifikante Erhöhung der Steady-State-Stromdichte um etwa den Faktor 2,6 zur Folge. Das angelegte Magnetfeld hat also ebenfalls einen positiven Effekt auf die Stromdichte, was vermutlich durch die erhöhte aktive Elektrodenoberfläche durch immobilisierte extrazelluläre magnetische FeS-NPs sowie eine verbesserte Lokalisation der Mikroorganismen auf der Anode erklärt werden kann.

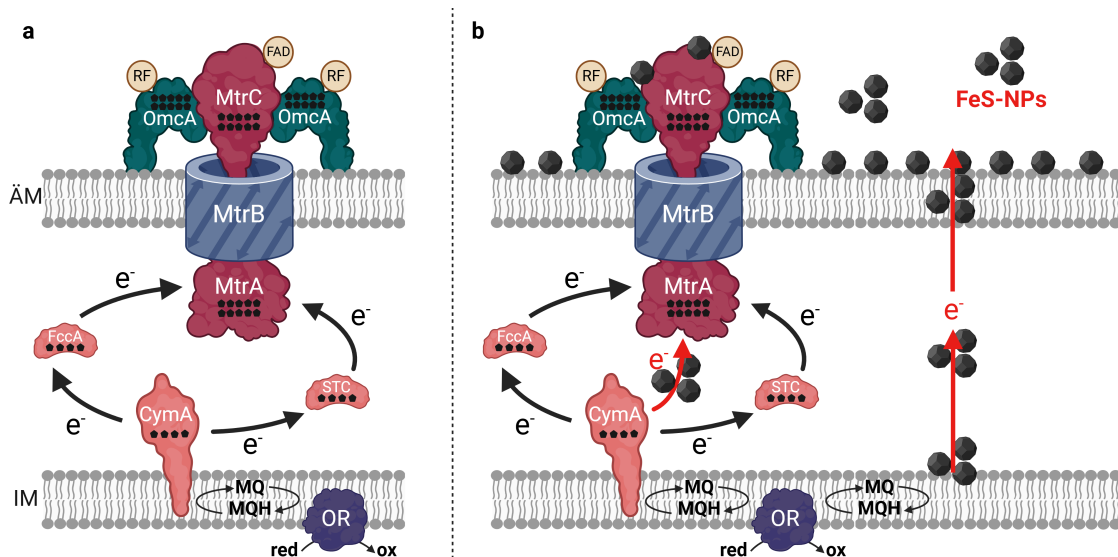


Abb. 21: Schematische Darstellung des klassischen EET bei *S. oneidensis* (a) und der von Fu *et al.* (2021) vorgeschlagene EET der FeS-*Shewanella*-Hybride (b). Die biosynthetisierten FeS-NPs können *c*-Typ-Cytochrome der Elektronentransportkette substituieren oder neue eigenständige Elektronentransportketten bilden. Modifizierte Reproduktion nach Fu *et al.* (2021).

Der erzielte Optimierungsfaktor von 2,6 ist den Optimierungsfaktoren von 4,5 (kommerzielle magnetische, leitfähige NPs; Abbildung 15c-IV) bzw. 21,9 (Kom-

bination kommerzieller NPs mit PEDOT:PSS-Aggregaten; Abbildung 15c-V) zwar unterlegen, jedoch zeigt dieser *proof of principle*, dass es möglich ist, die BES-Performance von *S. oneidensis* durch biogen synthetisierte magnetische NPs zu verbessern. Der Optimierungsfaktor kann voraussichtlich durch Feinabstimmung der Prozessparameter weiter nach oben getrieben werden. Darüber hinaus ist eine Kombination der FeS-*Shewanella*-Hybride mit den kommerziell erhältlichen NPs denkbar, um noch höhere Ausbeuten zu erzielen. Die FeS-NPs dienen dann vorrangig zum effizienteren Elektronentransport durch das Periplasma und auf extrazelluläre Akzeptoren, wohingegen die kommerziell erhältlichen magnetischen, leitfähigen NPs mit Eisenkern und Kohlenstoffhülle in erster Linie zur Ausbildung der dynamischen dreidimensionalen Erweiterung der Elektrodenoberfläche dienen würden.

5 Fazit und Ausblick

In dieser Studie wurde eine kürzlich beschriebene bioelektrochemische Mikrofluidikplattform zur Biofilmkultivierung und -analyse (Klein *et al.*, 2024a) verwendet, um die Bildung leitfähiger, magnetischer Mikrosäulen zu untersuchen, die durch leitfähige, magnetische NPs auf einer Elektrodenoberfläche aufgebaut wurden, sowie deren Auswirkungen auf anodische Biofilme von *S. oneidensis* und *G. sulfurreducens* zu untersuchen. Die Bewertung der Cytotoxizität der NPs ergab vernachlässigbare Auswirkungen auf die Zellviabilität und die Anwendung magnetischer, leitfähiger NPs führte bei beiden Organismen zu einer verbesserten Leistung in einem BES. Insbesondere bei *S. oneidensis* führte dies zu einer signifikanten, fast 5-fachen Verbesserung der Steady-State-Stromdichte, die durch die Kombination mit PEDOT:PSS-Aggregaten auf das fast 22-fache gesteigert wurde. Trotz dieser erheblichen Verbesserung blieb die stationäre Stromdichte bei etwa 1,6 % im Vergleich zu *G. sulfurreducens*, was auf weiteres Optimierungspotenzial zur Steigerung der Produktivität von anodischen *S. oneidensis*-Biofilmen hinweist. Im Fall von *G. sulfurreducens* wurde eine 4-fache Verkürzung der Anlaufzeit, aber keine Erhöhung der stationären Stromdichte beobachtet, wenn die kommerziell erhältlichen leitfähigen, magnetischen NPs als steuerbare Träger verwendet wurden.

Darüber hinaus konnte in einem *proof of principle* gezeigt werden, dass es möglich ist, durch biogene Synthese magnetische FeS-NPs herzustellen. Die dadurch gebildeten FeS-*Shewanella*-Hybride lassen sich ebenfalls durch extern angelegte Magnetfelder manipulieren und gezielt lokalisieren, wobei eine mehr als 2,5-fache signifikante Leistungssteigerung im BEs erzielt werden konnte.

Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass magnetische, leitfähige NPs als kosteneffiziente und einfach zu handhabende Erweiterung bereits bestehender BES dienen können, wobei lediglich ein Magnetfeld an der betreffenden Elektrode erforderlich wäre. Dieses Verfahren lässt sich vermutlich auf andere elektroaktive, biofilmbildende Mikroorganismen übertragen. Einschließlich möglicher Anwendungen im aufkommenden Feld der Elektrosynthese.

Die in dieser Arbeit erzielten Resultate tragen nicht nur zum besseren Verständnis des extrazellulären Elektronentransports in elektroaktiven Biofilmen bei. Sie zeigen des Weiteren Möglichkeiten zur biosynthetischen Optimierung bestehender BES auf molekularer Ebene auf, ohne dass auf gentechnische Methoden zurückgegriffen werden muss und eröffnen Raum für weiterführende Arbeiten unterschiedlicher Art.

So kann unter anderem die Funktionalisierung der extern eingesetzten magnetischen NPs forciert werden. Hier wäre beispielsweise der Einsatz des SpyTag/SpyCatcher-Systems denkbar, welches die irreversible Konjugation rekombinanter Proteine durch die Bindung einer intermolekularen Isopeptidbindung erlaubt (Zakeri *et al.*, 2012). SpyCatcher könnte auf den NPs immobilisiert und SpyTag durch den Einsatz gentechnischer Verfahren in einem membranständigen Oberflächenprotein, wie MtrC, verankert werden. Dies würde eine kovalente Bindung der leitfähigen NPs in möglichst unmittelbarer Nähe zur Elektronentransportkette des Organismus bedeuten und vermutlich zur besseren Anhaftung und einem verbesserten Elektronentransport führen.

Zukünftige Arbeiten zu diesem Thema könnten auch darauf abzielen, die Nutzbarkeit des angelegten Magnetfelds zu erweitern. In dieser Studie wurden Permanentmagneten zur Erzeugung des Magnetfelds verwendet. Ein Ersatz durch Elektromagneten könnte

die Kontrollierbarkeit und Vielseitigkeit des Systems weiter erhöhen. Durch die Applikation eines räumlich und zeitlich variierenden Musters von Magnetfeldern könnten die leitfähigen magnetischen Mikrosäulen beispielsweise einer permanenten bzw. zyklisch wiederkehrenden Umstrukturierung unterliegen, was die Diffusion des Substrats zur Elektrodenoberfläche verbessern könnte. Vergleichbare Erfolge erzielten Demirors *et al.* (2021), denen es gelang, sogenannte weiche Magnetteppiche herzustellen und darauf Flüssigkeitströpfchen mit einem sich veränderlichen Magnetfeld zu steuern.

Den vielleicht vielversprechendsten Ansatz zur Fortführung bietet vermutlich die Kombination von FeS-*Shewanella*-Hybriden mit den extrazellulär zugesetzten kommerziell erhältlichen magnetischen NPs. So können dynamische, steuerbare 3D-Elektroden erzeugt werden, welche außerdem auf molekularer Ebene möglichst gut mit den elektroaktiven Mikroorganismen vernetzt sind. Die Adressierung dieses Engpasses sollte zu einer weiteren Leistungssteigerung anodischer *Shewanella*-Biofilme führen und so der Performance von *Geobacter* ein weiteres Stück näherkommen. Der Einsatz dieser Technologie sollte darüber hinaus in produktiven Biofilmsystemen unabhängig von BES näher untersucht werden, da er ein einzigartiges Werkzeug zur Überwindung von Substratgradienten darstellen könnte.

Literaturverzeichnis

- Aiyer, K. S. (2020). How does electron transfer occur in microbial fuel cells? *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **36**:1–9.
- Aklujkar, M., J. Krushkal, G. Dibartolo, A. Lapidus, M. L. Land und D. R. Lovley. (2009). The genome sequence of *Geobacter metallireducens*: Features of metabolism, physiology and regulation common and dissimilar to *Geobacter sulfurreducens*. *BMC Microbiology*. **9**:1–22.
- Ali, I., C. Peng, Z. M. Khan, I. Naz, M. Sultan, M. Ali, I. A. Abbasi, T. Islam und T. Ye. (2019). Overview of microbes based fabricated biogenic nanoparticles for water and wastewater treatment. *Journal of Environmental Management*. **230**:128–150.
- Ameen, F., K. Alsamhary, J. A. Alabdullatif und S. AlNadhari. (2021). A review on metal-based nanoparticles and their toxicity to beneficial soil bacteria and fungi. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **213**:112027.
- Babauta, J. T., H. D. Nguyen, T. D. Harrington, R. Renslow und H. Beyenal. (2012). pH, Redox Potential and Local Biofilm Potential Microenvironments Within *Geobacter sulfurreducens* Biofilms and Their Roles in Electron Transfer. *Biotechnology and Bioengineering*. **109**:2651–2662.
- Barnes, E. O., X. Chen, P. Li und R. G. Compton. (2014). Voltammetry at porous electrodes: A theoretical study. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. **720-721**:92–100.
- Baudler, A., I. Schmidt, M. Langner, A. Greiner und U. Schröder. (2015). Does it have to be carbon? Metal anodes in microbial fuel cells and related bioelectrochemical systems. *Energy Environmental Science*. **8**:2048–2055.

- Bauer, A., M. Wagner, F. Saravia, S. Bartl, V. Hilgenfeldt und H. Horn. (2019). In-situ monitoring and quantification of fouling development in membrane distillation by means of optical coherence tomography. *Journal of Membrane Science*. **577**:145–152.
- Bazylnski, D. A., A. J. Garratt-Reed und R. B. Frankel. (1994). Electron microscopic studies of magnetosomes in magnetotactic bacteria. *Microscopy Research and Technique*. **27**:389–401.
- Bird, L. J., B. B. Kundu, T. Tschirhart, A. D. Corts, L. Su, J. A. Gralnick, C. M. Ajo-Franklin und S. M. Glaven. (2021). Engineering Wired Life: Synthetic Biology for Electroactive Bacteria. *ACS Synthetic Biology*. **10**:2808–2823.
- Bjerg, J. J., J. J. Lustermans, I. P. Marshall, A. J. Mueller, S. Brokjær, C. A. Thorup, P. Tataru, M. Schmid, M. Wagner, L. P. Nielsen und A. Schramm. (2023). Cable bacteria with electric connection to oxygen attract flocks of diverse bacteria. *Nature Communications*. **14**:1–8.
- Bjerg, J. T., H. T. Boschker, S. Larsen, D. Berry, M. Schmid, D. Millo, P. Tataru, F. J. Meysman, M. Wagner, L. P. Nielsen und A. Schramm. (2018). Long-distance electron transport in individual, living cable bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **115**:5786–5791.
- Blakemore, R. (1975). Magnetotactic Bacteria. *Science*. **190**:377–379.
- Bonanni, P. S., G. D. Schrott, L. Robuschi und J. P. Busalmen. (2012). Charge accumulation and electron transfer kinetics in *Geobacter sulfurreducens* biofilms. *Energy Environmental Science*. **5**:6188–6195.
- Boschker, H. T., P. L. Cook, L. Polerecky, R. T. Eachambadi, H. Lozano, S. Hidalgo-Martinez, D. Khalenkow, V. Spampinato, N. Claes, P. Kundu, D. Wang, S. Bals, K. K. Sand, F. Cavezza, T. Hauffman, J. T. Bjerg, A. G. Skirtach, K. Kochan, M. McKee, B. Wood, D. Bedolla, A. Gianoncelli, N. M. Geerlings, N. V. Gerven, H. Remaut, J. S. Geelhoed, R. Millan-Solsona, L. Fumagalli, L. P. Nielsen, A.

- Franquet, J. V. Manca, G. Gomila und F. J. Meysman. (2021). Efficient long-range conduction in cable bacteria through nickel protein wires. *Nature Communications*. **12**:1–12.
- Bradford, M. 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.
- Bretschger, O., A. Obraztsova, C. A. Sturm, S. C. In, Y. A. Gorby, S. B. Reed, D. E. Culley, C. L. Reardon, S. Barua, M. F. Romine, J. Zhou, A. S. Beliaev, R. Bouhenni, D. Saffarini, F. Mansfeld, B. H. Kim, J. K. Fredrickson und K. H. Nealson. (2007). Current production and metal oxide reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 wild type and mutants. *Applied and Environmental Microbiology*. **73**:7003–7012.
- Brunner, S., T. Klessing, A. Dötsch, K. Sturm-Richter und J. Gescher. (2019). Efficient bioelectrochemical conversion of industrial wastewater by specific strain isolation and community adaptation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. **7**:427533.
- Bücking, C., F. Popp, S. Kerzenmacher und J. Gescher. (2010). Involvement and specificity of *Shewanella oneidensis* outer membrane cytochromes in the reduction of soluble and solid-phase terminal electron acceptors. *FEMS Microbiology Letters*. **306**:144–151.
- Caccavo, F., D. J. Lonergan, D. R. Lovley, M. Davis, J. F. Stolz und M. J. McInerney. (1994). *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a hydrogen- and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism. *Applied and Environmental Microbiology*. **60**:3752–3759.
- Canstein, H. V., J. Ogawa, S. Shimizu und J. R. Lloyd. (2007). Secretion of Flavins by *Shewanella* Species and Their Role in Extracellular Electron Transfer. *Applied and Environmental Microbiology*. **74**:615–623.

- Cao, B., Z. Zhao, L. Peng, H. Y. Shiu, M. Ding, F. Song, X. Guan, C. K. Lee, J. Huang, D. Zhu, X. Fu, G. C. Wong, C. Liu, K. Nealson, P. S. Weiss, X. Duan und Y. Huang. (2021). Silver nanoparticles boost charge-extraction efficiency in *Shewanella* microbial fuel cells. *Science*. **373**:1336–1340.
- Cava, E. L., A. Guionet, J. Saito und A. Okamoto. (2020). Involvement of Proton Transfer for Carbon Dioxide Reduction Coupled with Extracellular Electron Uptake in *Shewanella oneidensis* MR-1. *Electroanalysis*. **32**:1659–1663.
- Champigneux, P., C. Renault-Sentenac, D. Bourrier, C. Rossi, M. L. Delia und A. Bergel. (2018). Effect of surface nano/micro-structuring on the early formation of microbial anodes with *Geobacter sulfurreducens*: Experimental and theoretical approaches. *Bioelectrochemistry*. **121**:191–200.
- Cheng, J., R. Xia, H. Li, Z. Chen, X. Zhou, X. Ren, H. Dong, R. Lin und J. Zhou. (2022). Enhancing Extracellular Electron Transfer of *Geobacter sulfurreducens* in Bioelectrochemical Systems Using N-Doped Fe₃O₄@Carbon Dots. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*. **10**:3935–3950.
- Cornejo, J. A., H. Sheng, E. Edri, C. M. Ajo-Franklin und H. Frei. (2018). Nanoscale membranes that chemically isolate and electronically wire up the abiotic/biotic interface. *Nature Communications*. **9**:1–8.
- Corte, S. D., T. Hennebel, B. D. Gusseme, W. Verstraete und N. Boon. (2012). Biopalladium: from metal recovery to catalytic applications. *Microbial Biotechnology*. **5**:5–17.
- Coursolle, D., D. B. Baron, D. R. Bond und J. A. Gralnick. (2010). The Mtr respiratory pathway is essential for reducing flavins and electrodes in *Shewanella oneidensis*. *Journal of Bacteriology*. **192**:467–474.
- Dang, Z., Y. Guan, Z. Wu, X. Y. Tao, Y. Xiong, H. B. Bai, C. S. Shao, G. Liu, Q. Huang, L. J. Tian und Y. C. Tian. (2021). Regulating the synthesis rate and

- yield of bio-assembled FeS nanoparticles for efficient cancer therapy. *Nanoscale*. **13**:18977–18986.
- Demirors, A. F., S. Aykut, S. Ganzeboom, Y. A. Meier und E. Poloni. (2021). Programmable droplet manipulation and wetting with soft magnetic carpets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **118**:e2111291118.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. **8**:881–890.
- Dubé, C. D. und S. R. Guiot. (2015). Direct Interspecies Electron Transfer in Anaerobic Digestion: A Review. *Biogas Science and Technology*. **151**:101–115.
- Engel, C., F. Schattenberg, K. Dohnt, U. Schröder, S. Müller und R. Krull. (2019). Long-term behavior of defined mixed cultures of *Geobacter sulfurreducens* and *Shewanella oneidensis* in bioelectrochemical systems. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. **7**:443540.
- Erben, J., X. Wang und S. Kerzenmacher. (2021). High Current Production of *Shewanella oneidensis* with Electrospun Carbon Nanofiber Anodes is Directly Linked to Biofilm Formation. *ChemElectroChem*. **8**:1836–1846.
- Fercher, A. F., K. Mengedoht und W. Werner. (1988). Eye-length measurement by interferometry with partially coherent light. *Optics Letters*. **13**:186–188.
- Flemming, H. C. und J. Wingender. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*. **8**:623–633.
- Flemming, H. C., J. Wingender, U. Szewzyk, P. Steinberg, S. A. Rice und S. Kjelleberg. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*. **14**:563–575.
- Fonseca, B. M., C. M. Paquete, S. E. Neto, I. Pacheco, C. M. Soares und R. O. Louro. (2013). Mind the gap: cytochrome interactions reveal electron pathways across the periplasm of *Shewanella oneidensis* MR-1. *The Biochemical Journal*. **449**:101–108.

- Franks, A. E., K. P. Nevin, R. H. Glaven und D. R. Lovley. (2009). Microtoming coupled to microarray analysis to evaluate the spatial metabolic status of *Geobacter sulfurreducens* biofilms. *The ISME Journal*. **4**:509–519.
- Fricke, K. (2009). Energieeffizienz kommunaler Kläranlagen. *Umweltbundesamt*.
- Fu, X. Z., J. Wu, S. Cui, X. M. Wang, H. Q. Liu, R. L. He, C. Yang, X. Deng, Z. L. Tan und W. W. Li. (2021). Self-regenerable bio-hybrid with biogenic ferrous sulfide nanoparticles for treating high-concentration chromium-containing wastewater. *Water Research*. **206**:117731.
- Golitsch, F., C. Bücking und J. Gescher. (2013). Proof of principle for an engineered microbial biosensor based on *Shewanella oneidensis* outer membrane protein complexes. *Biosensors and Bioelectronics*. **47**:285–291.
- Gralnick, J. A. und D. R. Bond. (2023). Electron Transfer Beyond the Outer Membrane: Putting Electrons to Rest. *Annual review of microbiology*. **77**:517–539.
- Hall-Stoodley, L., J. W. Costerton und P. Stoodley. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*. **2**:95–108.
- Hansen, S. H., T. Kabbeck, C. P. Radtke, S. Krause, E. Krolitzki, T. Peschke, J. Gasmi, K. S. Rabe, M. Wagner, H. Horn, J. Hubbuch, J. Gescher und C. M. Niemeyer. (2019). Machine-assisted cultivation and analysis of biofilms. *Scientific Reports*. **9**:1–10.
- Härrer, D., A. Elreedy, R. Ali, A. Hille-Reichel und J. Gescher. (2023). Probing the robustness of *Geobacter sulfurreducens* against fermentation hydrolysate for uses in bioelectrochemical systems. *Bioresource Technology*. **369**:128363.
- Heidelberg, J. F., I. T. Paulsen, K. E. Nelson, E. J. Gaidos, W. C. Nelson, T. D. Read, J. A. Eisen, R. Seshadri, N. Ward, B. Methe, R. A. Clayton, T. Meyer, A. Tsapin, J. Scott, M. Beanan, L. Brinkac, S. Daugherty, R. T. DeBoy, R. J. Dodson, A. S. Durkin, D. H. Haft, J. F. Kolonay, R. Madupu, J. D. Peterson, L. A.

- Umayam, O. White, A. M. Wolf, J. Vamathevan, J. Weidman, M. Impraim, K. Lee, K. Berry, C. Lee, J. Mueller, H. Khouri, J. Gill, T. R. Utterback, L. A. McDonald, T. V. Feldblyum, H. O. Smith, J. C. Venter, K. H. Nealson und C. M. Fraser. (2002). Genome sequence of the dissimilatory metal ion-reducing bacterium *Shewanella oneidensis*. *Nature Biotechnology*. **20**:1118–1123.
- Helz, G. R., I. Ciglenc̃ki, D. Krznarić und E. Bura-Nakić. (2011). Voltammetry of sulfide nanoparticles and the FeS(aq) problem. *ACS Symposium Series*. **1071**:265–282.
- Hennebel, T., B. D. Gusseme, N. Boon und W. Verstraete. (2009). Biogenic metals in advanced water treatment. *Trends in biotechnology*. **27**:90–98.
- Hu, Y., D. Rehnlund, E. Klein, J. Gescher und C. M. Niemeyer. (2020). Cultivation of Exoelectrogenic Bacteria in Conductive DNA Nanocomposite Hydrogels Yields a Programmable Biohybrid Materials System. *ACS Applied Materials and Interfaces*. **12**:14806–14813.
- Jeon, J. M., H. Park, H. M. Seo, J. H. Kim, S. K. Bhatia, G. Sathiyarayanan, H. S. Song, S. H. Park, K. Y. Choi, B. I. Sang und Y. H. Yang. (2015). Isobutanol production from an engineered *Shewanella oneidensis* MR-1. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. **38**:2147–2154.
- Jiang, Y., P. Li, Y. Wang, L. P. Jiang, R. B. Song, J. R. Zhang und J. J. Zhu. (2020). Trifunctional modification of individual bacterial cells for magnet-assisted bioanodes with high performance in microbial fuel cells. *Journal of Materials Chemistry A*. **8**:24515–24523.
- Kerisit, S., K. M. Rosso, M. Dupuis und M. Valiev. (2007). Molecular Computational Investigation of Electron Transfer Kinetics across Cytochrome-Iron Oxide Interfaces. *Journal of Physical Chemistry C*, **111**:11363–11375.

- Kim, B.-H., H.-J. Kim, M.-S. Hyun und D.-H. Park. (1999). Direct Electrode Reaction of Fe(3)-Reducing Bacterium , *Shewanella putrefaciens*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. **9**:127–131.
- Kimber, R. L., E. A. Lewis, F. Parmeggiani, K. Smith, H. Bagshaw, T. Starborg, N. Joshi, A. I. Figueroa, G. van der Laan, G. Cibin, D. Gianolio, S. J. Haigh, R. A. Patrick, N. J. Turner und J. R. Lloyd. (2018). Biosynthesis and Characterization of Copper Nanoparticles Using *Shewanella oneidensis*: Application for Click Chemistry. *Small*. **14**:1703145.
- Kipf, E., J. Erben, R. Zengerle, J. Gescher und S. Kerzenmacher. (2018). Systematic investigation of anode materials for microbial fuel cells with the model organism *G. sulfurreducens*. *Bioresource Technology Reports*. **2**:29–37.
- Kitayama, M., R. Koga, T. Kasai, A. Kouzuma und K. Watanabe. (2017). Structures, compositions, and activities of live *Shewanella* biofilms formed on graphite electrodes in electrochemical flow cells. *Applied and Environmental Microbiology*. **83**:e00903–17.
- Klein, E., R. Wurst, D. Rehnlund und J. Gescher. (2024). Elucidating the development of cooperative anode-biofilm-structures. *Biofilm*. **7**:100193.
- Klein, E. M., M. T. Knoll und J. Gescher. (2023). Microbe–Anode Interactions: Comparing the impact of genetic and material engineering approaches to improve the performance of microbial electrochemical systems (MES). *Microbial Biotechnology*. **16**:1179–1202.
- Klein, E. M., H. Heintz, R. Wurst, S. Schuldt, H. Hähl, K. Jacobs und J. Gescher. (2024). Comparative analysis of the influence of BpfA and BpfG on biofilm development and current density in *Shewanella oneidensis* under oxic, fumarate- and anode-respiring conditions. *Scientific Reports*. **14**:1–12.

- Kneuer, L., R. Wurst und J. Gescher. (2024). *Shewanella oneidensis*: Biotechnological Application of Metal-Reducing Bacteria. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Epub ahead of print.
- Knoll, M. T., E. Fuderer und J. Gescher. (2022). Sprayable biofilm - Agarose hydrogels as 3D matrix for enhanced productivity in bioelectrochemical systems. *Biofilm*. **4**:100077.
- Kotloski, N. J. und J. A. Gralnick. (2013). Flavin electron shuttles dominate extracellular electron transfer by *Shewanella oneidensis*. *mBio*. **4**:e00553–12.
- Law, C. K. Y., L. Bonin, B. D. Gusseme, N. Boon und K. Kundu. (2022). Biogenic synthesis of palladium nanoparticles: New production methods and applications. *Nanotechnology Reviews*. **11**:3104–3124.
- Le, Q. A. T., H. G. Kim und Y. H. Kim. (2018). Electrochemical synthesis of formic acid from CO₂ catalyzed by *Shewanella oneidensis* MR-1 whole-cell biocatalyst. *Enzyme and microbial technology*. **116**:1–5.
- Lehner, B. A., V. A. Janssen, E. M. Spiesz, D. Benz, S. J. Brouns, A. S. Meyer und H. S. van der Zant. (2019). Creation of Conductive Graphene Materials by Bacterial Reduction Using *Shewanella Oneidensis*. *ChemistryOpen*. **8**:888–895.
- Li, C. und S. Cheng. (2019). Functional group surface modifications for enhancing the formation and performance of exoelectrogenic biofilms on the anode of a bioelectrochemical system. *Critical Reviews in Biotechnology*. **39**:1015–1030.
- Li, F., L. Wang, C. Liu, D. Wu und H. Song. (2018). Engineering exoelectrogens by synthetic biology strategies. *Current Opinion in Electrochemistry*. **10**:37–45.
- Lin, W. C., M. V. Coppi und D. R. Lovley. (2004). *Geobacter sulfurreducens* Can Grow with Oxygen as a Terminal Electron Acceptor. *Applied and Environmental Microbiology*. **70**:2525–2528.
- Liu, Y., Z. Wang, J. Liu, C. Levar, M. J. Edwards, J. T. Babauta, D. W. Kennedy, Z. Shi, H. Beyenal, D. R. Bond, T. A. Clarke, J. N. Butt, D. J. Richardson,

- K. M. Rosso, J. M. Zachara, J. K. Fredrickson und L. Shi. (2014). A trans-outer membrane porin-cytochrome protein complex for extracellular electron transfer by *Geobacter sulfurreducens* PCA. *Environmental Microbiology Reports*. **6**:776–785.
- Lloyd, J. R., C. Leang, A. L. H. Myerson, M. V. Coppi, S. Cui, B. Methe, S. J. Sandler und D. R. Lovley. (2003). Biochemical and genetic characterization of PpcA, a periplasmic *c*-type cytochrome in *Geobacter sulfurreducens*. *Biochemical Journal*. **369**:153–161.
- Logan, B. E. (2009). Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. *Nature Reviews Microbiology*. **7**:375–381.
- Logan, B. E., B. Hamelers, R. Rozendal, U. Schröder, J. Keller, S. Freguia, P. Aelterman, W. Verstraete und K. Rabaey. (2006). Microbial fuel cells: methodology and technology. *Environmental Science and Technology*. **40**:5181–5192.
- Logan, B. E. und J. M. Regan. (2006). Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. *Trends in Microbiology*. **14**:512–518.
- Lovley, D. R. (2006). Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*. **4**:497–508.
- Lovley, D. R. (2012). Electromicrobiology. *Annual Review of Microbiology*. **66**:391–409.
- Lovley, D. R. und D. E. Holmes. (2020). Protein Nanowires: the Electrification of the Microbial World and Maybe Our Own. *Journal of Bacteriology*. **202**:e00331–20.
- Lovley, D. R., T. Ueki, T. Zhang, N. S. Malvankar, P. M. Shrestha, K. A. Flanagan, M. Aklujkar, J. E. Butler, L. Giloteaux, A. E. Rotaru, D. E. Holmes, A. E. Franks, R. Orellana, C. Risso und K. P. Nevin. (2011). *Geobacter*: the microbe electric's physiology, ecology, and practical applications. *Advances in Microbial Physiology*. **59**:1–100.

- Maes, S., R. Props, J. P. Fitts, R. D. Smet, F. Vanhaecke, N. Boon und T. Hennebel. (2017). Biological Recovery of Platinum Complexes from Diluted Aqueous Streams by Axenic Cultures. *PLOS ONE*. **12**:e0169093.
- Magni, M., E. R. Jones, M. F. Bierkens und M. T. van Vliet. (2025). Global energy consumption of water treatment technologies. *Water Research*. **277**:123245.
- Maktabifard, M., H. E. Al-Hazmi, P. Szulc, M. Mousavizadegan, X. Xu, E. Zabrowska, X. Li und J. Małkinia. (2023). Net-zero carbon condition in wastewater treatment plants: A systematic review of mitigation strategies and challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **185**:113638.
- Malek, T. J., S. H. Chaki und M. P. Deshpande. (2018). Structural, morphological, optical, thermal and magnetic study of mackinawite FeS nanoparticles synthesized by wet chemical reduction technique. *Physica B: Condensed Matter*. **546**:59–66.
- Malvankar, N. S., M. T. Tuominen und D. R. Lovley. (2012). Lack of cytochrome involvement in long-range electron transport through conductive biofilms and nanowires of *Geobacter sulfurreducens*. *Energy Environmental Science*. **5**:8651–8659.
- Marritt, S. J., D. G. McMillan, L. Shi, J. K. Fredrickson, J. M. Zachara, D. J. Richardson, L. J. Jeuken und J. N. Butt. (2012). The roles of CymA in support of the respiratory flexibility of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Biochemical Society transactions*. **40**:1217–1221.
- McCreery, R. L. (2008). Advanced carbon electrode materials for molecular electrochemistry. *Chemical Reviews*. **108**:2646–2687.
- Mclean, J. S., G. Wanger, Y. A. Gorby, M. Wainstein, J. Mcquaid, S. I. Ishii, O. Bretschger, H. Beyenal und K. H. Nealson. (2010). Quantification of electron transfer rates to a solid phase electron acceptor through the stages of biofilm formation from single cells to multicellular communities. *Environmental Science and Technology*. **44**:2721–2727.

- Methé, B. A., K. E. Nelson, J. A. Eisen, I. T. Paulsen, W. Nelson, J. F. Heidelberg, D. Wu, M. Wu, N. Ward, M. J. Beanan, R. J. Dodson, R. Madupu, L. M. Brinkac, S. C. Daugherty, R. T. DeBoy, A. S. Durkin, M. Gwinn, J. F. Kolonay, S. A. Sullivan, D. H. Haft, J. Selengut, T. M. Davidsen, N. Zafar, O. White, B. Tran, C. Romero, H. A. Forberger, J. Weidman, H. Khouri, H. Khouri, T. V. Feldblyum, T. R. Utterback, S. E. V. Aken, D. R. Lovley und C. M. Fraser. (2003). Genome of *Geobacter sulfurreducens*: metal reduction in subsurface environments. *Science*. **302**:1967–1969.
- Meyer, T. E., A. I. Tsapin, I. Vandenberghe, L. D. Smet, D. Frishman, K. H. Nealson, M. A. Cusanovich und J. J. V. Beeumen. (2004). Identification of 42 possible cytochrome C genes in the *Shewanella oneidensis* genome and characterization of six soluble cytochromes. *Omics: A Journal of Integrative Biology*. **8**:57–77.
- Morgan-Sagastume, F., P. Larsen, J. L. Nielsen und P. H. Nielsen. (2008). Characterization of the loosely attached fraction of activated sludge bacteria. *Water Research*. **42**:843–854.
- Moscoviz, R., J. Toledo-Alarcón, E. Trably und N. Bernet. (2016). Electro-Fermentation: How To Drive Fermentation Using Electrochemical Systems. *Trends in Biotechnology*. **34**:856–865.
- Myers, C. R. und K. H. Nealson. (1988). Microbial reduction of manganese oxides: Interactions with iron and sulfur. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. **52**:2727–2732.
- Neal, A. L., K. M. Rosso, G. G. Geesey, Y. A. Gorby und B. J. Little. (2003). Surface structure effects on direct reduction of iron oxides by *Shewanella oneidensis*. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. **67**:4489–4503.
- Niederste-Hollenberg, J., J. Winkler, M. Fritz, L. Zheng, T. Hillenbrand, G. Kolisch, G. Schirmer, J. Borger, H. Doderer und I. Dörrfuß. (2021). Klimaschutz- und Energieeffizienzpotenziale in der Abwasserwirtschaft - aktueller Stand und Perspektiven. *Bericht des Umweltbundesamtes*.

- Nielsen, L. P., N. Risgaard-Petersen, H. Fossing, P. B. Christensen und M. Sayama. (2010). Electric currents couple spatially separated biogeochemical processes in marine sediment. *Nature*. **463**:1071–1074.
- Okamoto, A., K. Hashimoto, K. H. Nealson und R. Nakamura. (2013). Rate enhancement of bacterial extracellular electron transport involves bound flavin semiquinones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **110**:7856–7861.
- Okamoto, A., R. Nakamura, K. H. Nealson und K. Hashimoto. (2014). Bound Flavin Model Suggests Similar Electron-Transfer Mechanisms in *Shewanella* and *Geobacter*. *ChemElectroChem*. **1**:1808–1812.
- Okamoto, A., K. Saito, K. Inoue, K. H. Nealson, K. Hashimoto und R. Nakamura. (2014). Uptake of self-secreted flavins as bound cofactors for extracellular electron transfer in *Geobacter* species. *Energy and Environmental Science*. **7**:1357–1361.
- Otero, F. J., C. H. Chan und D. R. Bond. (2018). Identification of Different Putative Outer Membrane Electron Conduits Necessary for Fe(III) Citrate, Fe(III) Oxide, Mn(IV) Oxide, or Electrode Reduction by *Geobacter sulfurreducens*. *Journal of Bacteriology*. **200**:e00347–18.
- Pearce, C. I., R. A. Patrick, N. Law, J. M. Charnock, V. S. Coker, J. W. Fellowes, R. S. Oremland und J. R. Lloyd. (2009). Investigating different mechanisms for biogenic selenite transformations: *Geobacter sulfurreducens*, *Shewanella oneidensis* and *Veillonella atypica*. *Environmental Technology*. **30**:1313–1326.
- Philipp, L. A., K. Bühler, R. Ulber und J. Gescher. (2024). Beneficial applications of biofilms. *Nature Reviews Microbiology*. **22**:276–290.
- Philipp, L. A., M. Edel und J. Gescher. (2020). Genetic engineering for enhanced productivity in bioelectrochemical systems. *Advances in Applied Microbiology*. **111**:1–31.

- Pirbadian, S., S. E. Barchinger, K. M. Leung, H. S. Byun, Y. Jangir, R. A. Bouhenni, S. B. Reed, M. F. Romine, D. A. Saffarini, L. Shi, Y. A. Gorby, J. H. Golbeck und M. Y. El-Naggar. (2014). *Shewanella oneidensis* MR-1 nanowires are outer membrane and periplasmic extensions of the extracellular electron transport components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **111**:12883–12888.
- Potter, M. C. (1911). Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*. **84**:260–276.
- Qasem, N. A. und G. A. Abdulrahman. (2024). A Recent Comprehensive Review of Fuel Cells: History, Types, and Applications. *International Journal of Energy Research*. **2024**:7271748.
- Rabaey, K. und R. A. Rozendal. (2010). Microbial electrosynthesis — revisiting the electrical route for microbial production. *Nature Reviews Microbiology*. **8**:706–716.
- Reguera, G., K. D. McCarthy, T. Mehta, J. S. Nicoll, M. T. Tuominen und D. R. Lovley. (2005). Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature*. **435**:1098–1101.
- Reguera, G., K. P. Nevin, J. S. Nicoll, S. F. Covalla, T. L. Woodard und D. R. Lovley. (2006). Biofilm and nanowire production leads to increased current in *Geobacter sulfurreducens* fuel cells. *Applied and Environmental Microbiology*. **72**:7345–7348.
- Rominger, L., M. Hackbarth, T. Jung, M. Scherzinger, L. F. M. Rosa, H. Horn, M. Kaltschmitt, C. Picioreanu und J. Gescher. (2024). Efficiency and process development for microbial biomass production using oxidic bioelectrosynthesis. *Trends in Biotechnology*. **43**:673–695.
- Salar-Garcia, M. J., F. Montilla, C. Quijada, E. Morallon und I. Ieropoulos. (2020). Improving the power performance of urine-fed microbial fuel cells using PEDOT-PSS modified anodes. *Applied Energy*. **278**:115528.

- Santos, T. C., M. A. Silva, L. Morgado, J. M. Dantas und C. A. Salgueiro. (2015). Diving into the redox properties of *Geobacter sulfurreducens* cytochromes: a model for extracellular electron transfer. *Dalton Transactions*. **44**:9335–9344.
- Sauer, K., P. Stoodley, D. M. Goeres, L. Hall-Stoodley, M. Burmølle, P. S. Stewart und T. Bjarnsholt. (2022). The biofilm life cycle—expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology*. **20**:608–620.
- Schievano, A., T. P. Sciarria, K. Vanbroekhoven, H. D. Wever, S. Puig, S. J. Andersen, K. Rabaey und D. Pant. (2016). Electro-Fermentation – Merging Electrochemistry with Fermentation in Industrial Applications. *Trends in Biotechnology*. **34**:866–878.
- Schindelin, J., I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.-Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak und A. Cardona. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*. **9**:676–682.
- Schkolnik, G., M. Schmidt, M. G. Mazza, F. Harnisch und N. Musat. (2015). In Situ Analysis of a Silver Nanoparticle-Precipitating *Shewanella* Biofilm by Surface Enhanced Confocal Raman Microscopy. *PLOS ONE*. **10**:e0145871.
- Schröder, U. (2011). Discover the possibilities: Microbial bioelectrochemical systems and the revival of a 100-year-old discovery. *Journal of Solid State Electrochemistry*. **15**:1481–1486.
- Shrestha, R., D. R. Joshi, J. Gopali und S. Piya. (2009). Oligodynamic Action of Silver, Copper and Brass on Enteric Bacteria Isolated from Water of Kathmandu Valley. *Nepal Journal of Science and Technology*. **10**:189–193.
- Smart, L. und E. Moore. (1997). *Einführung in die Festkörperchemie (German Edition)*: Vieweg.
- Smith, R. E. G., T. J. Davies, N. D. B. Baynes und R. J. Nichols. (2015). The electrochemical characterisation of graphite felts. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. **747**:29–38.

- Stříteský, S., A. Marková, J. Víteček, E. Šafaříková, M. Hrabal, L. Kubáč, L. Kubala, M. Weiter und M. Vala. (2018). Printing inks of electroactive polymer PEDOT:PSS: The study of biocompatibility, stability, and electrical properties. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. **106**:1121–1128.
- Strycharz-Glaven, S. M., R. M. Snider, A. Guiseppi-Elie und L. M. Tender. (2011). On the electrical conductivity of microbial nanowires and biofilms. *Energy and Environmental Science*. **4**:4366–4379.
- Sturm, G., K. Richter, A. Doetsch, H. Heide, R. O. Louro und J. Gescher. (2015). A dynamic periplasmic electron transfer network enables respiratory flexibility beyond a thermodynamic regulatory regime. *ISME Journal*. **9**:1802–1811.
- Su, L., W. Jia, C. Hou und Y. Lei. (2011). Microbial biosensors: a review. *Biosensors and Bioelectronics*. **26**:1788–1799.
- Sydow, A., T. Krieg, F. Mayer, J. Schrader und D. Holtmann. (2014). Electroactive bacteria—molecular mechanisms and genetic tools. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **98**:8481–8495.
- Thorup, C., C. Petro, A. Bøggild, T. S. Ebsen, S. Brokjær, L. P. Nielsen, A. Schramm und J. J. Bjerg. (2021). How to grow your cable bacteria: Establishment of a stable single-strain culture in sediment and proposal of *Candidatus* *Electronema aureum* GS. *Systematic and Applied Microbiology*. **44**:126236.
- Torres, C. I., A. K. Marcus, H. S. Lee, P. Parameswaran, R. Krajmalnik-Brown und B. E. Rittmann. (2010). A kinetic perspective on extracellular electron transfer by anode-respiring bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. **34**:3–17.
- Torres, C. I., A. K. Marcus und B. E. Rittmann. (2008). Proton transport inside the biofilm limits electrical current generation by anode-respiring bacteria. *Biotechnology and Bioengineering*. **100**:872–881.
- Tseng, C. P., F. Liu, X. Zhang, P. C. Huang, I. Campbell, Y. Li, J. T. Atkinson, T. Terlier, C. M. Ajo-Franklin, J. J. Silberg und R. Verduzco. (2022). Solution-

- Deposited and Patternable Conductive Polymer Thin-Film Electrodes for Microbial Bioelectronics. *Advanced Materials*. **34**:2109442.
- Venkateswaran, K., D. P. Moser, M. E. Dollhopf, D. P. Lies, D. A. Saffarini, B. J. MacGregor, D. B. Ringelberg, D. C. White, M. Nishijima, H. Sano, J. Burghardt, E. Stackebrandt und K. H. Nealsen. (1999). Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **49**:705–724.
- Wagner, M. und H. Horn. (2017). Optical coherence tomography in biofilm research: A comprehensive review. *Biotechnology and Bioengineering*. **114**:1386–1402.
- Webster, D. P., M. A. TerAvest, D. F. Doud, A. Chakravorty, E. C. Holmes, C. M. Radens, S. Sureka, J. A. Gralnick und L. T. Angenent. (2014). An arsenic-specific biosensor with genetically engineered *Shewanella oneidensis* in a bioelectrochemical system. *Biosensors and Bioelectronics*. **62**:320–324.
- West, A. R. (1999). *Basic Solid State Chemistry*: John Wiley und Sons.
- Williams, D. B. und C. B. Carter. (2009). *Transmission electron microscopy: A textbook for materials science*: Springer US.
- Wu, R., L. Cui, L. Chen, C. Wang, C. Cao, G. Sheng, H. Yu und F. Zhao. (2013). Effects of Bio-Au Nanoparticles on Electrochemical Activity of *Shewanella oneidensis* Wild Type and omcA/mtrC Mutant. *Scientific Reports*. **3**:1–7.
- Wurst, R., E. Klein und J. Gescher. (2024). Magnetic, conductive nanoparticles as building blocks for steerable micropillar-structured anodic biofilms. *Biofilm*. **8**:100226.
- Xiong, X., Y. Li und C. Zhang. (2024). Cable bacteria: Living electrical conduits for biogeochemical cycling and water environment restoration. *Water Research*. **253**:121345.

- Xu, S., H. Liu, Y. Fan, R. Schaller, J. Jiao und F. Chaplen. (2012). Enhanced performance and mechanism study of microbial electrolysis cells using Fe nanoparticle-decorated anodes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **93**:871–880.
- Xu, S., Y. Jangir und M. Y. El-Naggar. (2016). Disentangling the roles of free and cytochrome-bound flavins in extracellular electron transport from *Shewanella oneidensis* MR-1. *Electrochimica Acta*. **198**:49–55.
- Yan, X., H. S. Lee, N. Li und X. Wang. (2020). The micro-niche of exoelectrogens influences bioelectricity generation in bioelectrochemical systems. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **134**:110184.
- Yang, C., H. Aslan, P. Zhang, S. Zhu, Y. Xiao, L. Chen, N. Khan, T. Boesen, Y. Wang, Y. Liu, L. Wang, Y. Sun, Y. Feng, F. Besenbacher, F. Zhao und M. Yu. (2020). Carbon dots-fed *Shewanella oneidensis* MR-1 for bioelectricity enhancement. *Nature Communications*. **11**:1–11.
- Yang, T., M. Yang, C. Xu, K. Yang, Y. Su, Y. Ye, L. Dou, Q. Yang, W. Ke, B. Wang und Z. Luo. (2023). PEDOT:PSS hydrogels with high conductivity and biocompatibility for *in situ* cell sensing. *Journal of Materials Chemistry B*. **11**:3226–3235.
- Ye, J., G. Ren, C. Wang, A. Hu, F. Li, S. Zhou und Z. He. (2021). A facile and fast strategy for cathodic electroactive-biofilm assembly via magnetic nanoparticle bioconjugation. *Biosensors and Bioelectronics*. **190**:113464.
- Yin, W., Y. Wang, L. Liu und J. He. (2019). Biofilms: The Microbial Protective Clothing in Extreme Environments. *International Journal of Molecular Sciences*. **20**:3423.
- Yu, Y. Y., Y. Z. Wang, Z. Fang, Y. T. Shi, Q. W. Cheng, Y. X. Chen, W. Shi und Y. C. Yong. (2020). Single cell electron collectors for highly efficient wiring-up electronic abiotic/biotic interfaces. *Nature Communications*. **11**:1–10.

- Zacharoff, L., C. H. Chan und D. R. Bond. (2016). Reduction of low potential electron acceptors requires the CbcL inner membrane cytochrome of *Geobacter sulfurreducens*. *Bioelectrochemistry*. **107**:7–13.
- Zajdel, T. J., M. Baruch, G. Méhes, E. Stavrinidou, M. Berggren, M. M. Maharbiz, D. T. Simon und C. M. Ajo-Franklin. (2018). PEDOT:PSS-based Multilayer Bacterial-Composite Films for Bioelectronics. *Scientific Reports*. **8**:1–12.
- Zakeri, B., J. O. Fierer, E. Celik, E. C. Chittock, U. Schwarz-Linek, V. T. Moy und M. Howarth. (2012). Peptide tag forming a rapid covalent bond to a protein, through engineering a bacterial adhesin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **109**:E690.
- Zhou, L., Y. Wang, L. Sun, B. Tan, X. Luo und Y. Yuan. (2018). Magnet-assisted rapid and controllable construction of an electroactive biofilm for microbial current generation. *Journal of Power Sources*. **403**:97–102.
- Zhu, P. und Y. Zhao. (2019). Cyclic voltammetry measurements of electroactive surface area of porous nickel: Peak current and peak charge methods and diffusion layer effect. *Materials Chemistry and Physics*. **233**:60–67.

Anhang

Die ergänzenden Videos 1 - 4 können unter folgender DOI abgerufen werden:

<https://doi.org/10.15480/882.14901>.

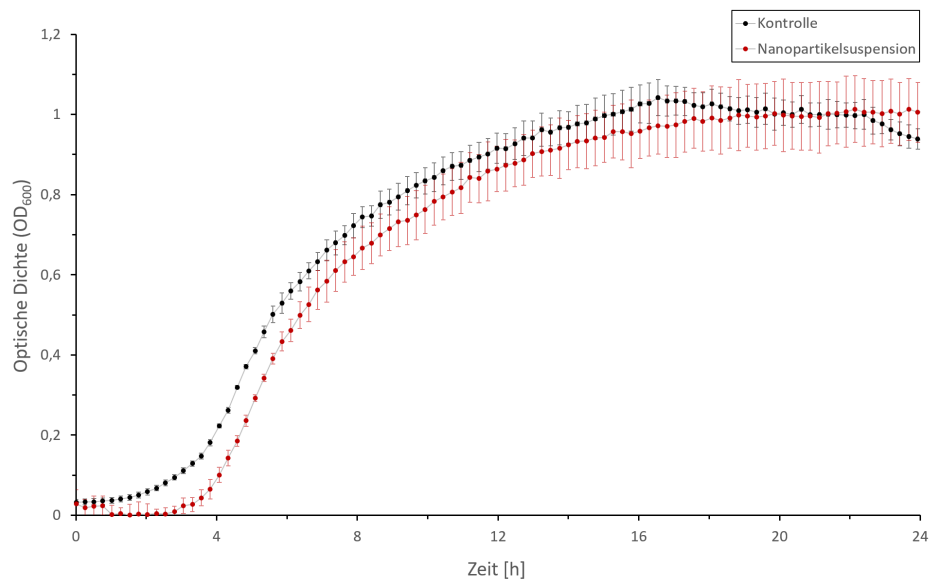


Abb. A1: *S. oneidensis* Wachstumskurven in An- und Abwesenheit magnetischer, leitfähiger NPs mit Eisenkern und hydrophober Kohlenstoffhülle. Es konnte kein signifikanter Unterschied im Wachstumsverhalten festgestellt werden. Experimente wurden in Quadruplikaten durchgeführt (ungepaarter *t*-Test: $p > 0,5$).

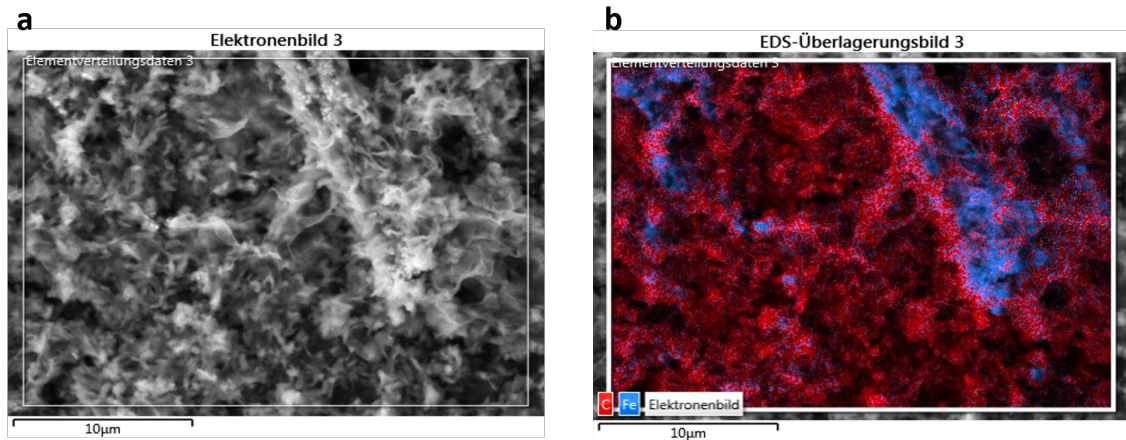


Abb. A2: **EDX-Analyse** einer Mikrosäule des anodischen *G. sulfurreducens* Biofilms. **a** zeigt die elektronenmikroskopische Aufnahme und **b** die zugehörige EDX-Analyse. Es ist ersichtlich, dass die Mikrosäulen aus den eingesetzten NP-Bausteinen mit Eisenkern und Graphithülle aufgebaut sind.

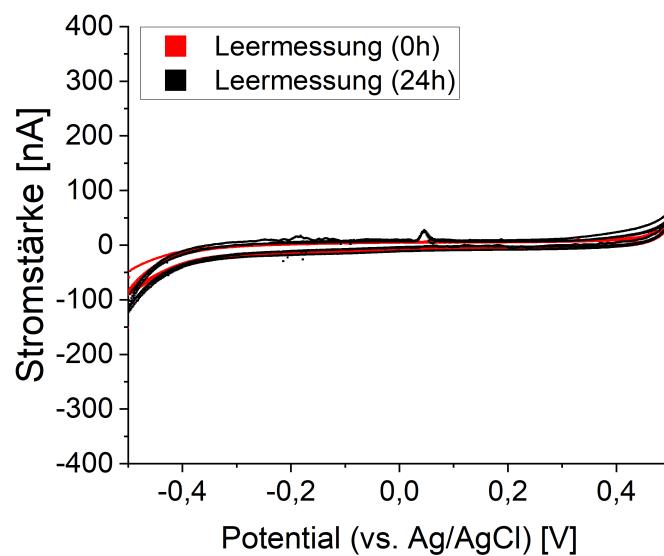


Abb. A3: **Leermessungen** vor der elektrochemischen Analyse der FeS-*Shewanella*-Hybride. Cyclovoltammetrie der Dickfilmelektroden bevor die immobilisierten FeS-*Shewanella*-Hybride nach 0 h (rot), bzw. 24 h (schwarz) vermessen wurden. Beide Elektroden zeigen leer keine Anwesenheit redoxaktiver Spezies.