

Automatisierte Charakterisierung und Optimierung elektroaktiver Biofilme

Vom Promotionsausschuss der
Technischen Universität Hamburg

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Edina Marlen Klein

aus

Hamburg

2024

Gutachter:	Prof. Dr. Johannes Gescher Prof. Dr. Anna-Lena Heins
Vorsitzender des Prüfungsausschusses:	Prof. Dr. Andreas Liese
Tag der mündlichen Prüfung:	15. Mai 2024
DOI:	https://doi.org/10.15480/882.13235
Handle:	https://hdl.handle.net/11420/48852
 ORCID:	https://orcid.org/0000-0001-9642-0218

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

Mikrobielle elektrochemische Systeme (MES) repräsentieren eine äußerst vielseitige Plattformtechnologie mit enormem Potenzial für die Entwicklung einer nachhaltigen Bioökonomie, wobei die industrielle Umsetzung dieses Potenzials einen kritischen Fokus auf die Biofilmoptimierung erfordert. Um in der Lage zu sein, Biofilmentwicklung und Stromproduktion direkt miteinander zu korrelieren sowie die Biofilmaktivität räumlich aufzulösen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine mikrofluidische Kultivierungsplattform mit integrierter automatisierter dreidimensionaler Bildgebung etabliert. Die Validierung der Plattform erfolgte durch Untersuchung einer Modellgemeinschaft aus *Geobacter sulfurreducens* und *Shewanella oneidensis*. Hierbei konnte eine Co-Abhängigkeit festgestellt werden, in der *G. sulfurreducens* auf die Nährstoffversorgung durch *S. oneidensis* angewiesen ist, während *S. oneidensis* seinerseits die von *G. sulfurreducens* entwickelte leitfähige Biofilm-Matrix nutzt und so einen direkten Interspezies-Elektronentransfer (DIET) zur Anode durchführt. Darüber hinaus wurde der Einfluss verschiedener genetischer Faktoren auf die Biofilmentwicklung von *S. oneidensis* fundamental untersucht. Als Wirtstamm für diese Untersuchungen wurde *S. oneidensis* MR-1 $\Delta\lambda$ genutzt, basierend auf der Hypothese, dass die $\Delta\lambda$ -induzierte Reduktion der extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) den Elektronentransport durch den Biofilm deutlich vereinfacht. Durch die Untersuchung verschiedener genetischer Faktoren konnte nachgewiesen werden, dass unter oxischen Bedingungen andere regulatorische Routinen die Biofilmbildung zu bestimmen scheinen, wohingegen unter anoxischen Bedingungen mit Fumarat als Elektronenakzeptor sowohl qualitative als auch quantitative Unterschiede zu den Kontrollstämmen festgestellt werden konnten. Unter Verwendung einer Anode als terminalem Elektronenakzeptor führten die Co-Überexpression von *wbpA* und *wbpP*, die Überexpression von *bpfA*, eine punktmutierte *bpfG*-Variante sowie die einfache Zugabe eines leeren Plasmidvektors zur 1,67 - 1,85-fachen Erhöhung der mittleren Stromdichte. Zusammengefasst konnten im Rahmen dieser Arbeit Schlüsselfaktoren der anaeroben Biofilmbildung identifiziert und näher charakterisiert werden, was eine Grundlage für die Kultivierung von Biofilmen mit optimierten benutzerdefinierten Eigenschaften darstellt.

Abstract

Microbial electrochemical systems (MES) represent a highly versatile platform technology with an immense potential for the development towards a sustainable bioeconomy, whereby the industrial realization of this potential requires a critical focus on biofilm optimization. In order to be able to directly correlate biofilm development and current production as well as spatially resolve biofilm activity, a microfluidic cultivation platform with integrated automated three-dimensional imaging was established. The platform was validated by investigating a model community of *G. sulfurreducens* and *S. oneidensis*, revealing a co-dependency in which *G. sulfurreducens* relies on the nutrient supply from *S. oneidensis*, while *S. oneidensis* in turn utilizes the conductive biofilm matrix developed by *G. sulfurreducens*, facilitating direct interspecies electron transfer (DIET) to the anode. Moreover, the influence of different genetic factors on the biofilm development of *S. oneidensis* was fundamentally investigated. The host strain used for these studies was *S. oneidensis* MR-1 $\Delta\lambda$, based on the hypothesis that the $\Delta\lambda$ -induced reduction of extracellular polymeric substances (EPS) significantly facilitates electron transport through the biofilm. By investigating various genetic factors, it could be shown that under oxic conditions, superordinate mechanisms seem to take effect and determine biofilm development, whereas under anoxic conditions with fumarate as electron acceptor, both qualitative and quantitative differences compared to the control strains could be determined. Using an anode as the terminal electron acceptor, co-overexpression of *wbpA* and *wbpP*, overexpression of *bpfA*, a point-mutated *bpfG* variant and the simple addition of an empty plasmid vector led to a 1.67 - 1.85-fold increase in mean current density. In summary, this work identified and characterized key factors of anaerobic biofilm formation, providing a basis for the cultivation of biofilms with optimized user-defined properties.

Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt zunächst Prof. Dr. Johannes Gescher für die Möglichkeit, meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können. Danke, dass du mich auf dem Weg von einer Studentin zu einer selbstbewussten Wissenschaftlerin begleitet und unterstützt hast. Selbst in den schwierigsten und Frust-reichsten Zeiten, in denen ich kaum an mich glauben konnte, hast du weiterhin Vertrauen in mich und meine Arbeit gehabt. Dabei hast du mir trotzdem stets Raum für meine eigenen Ideen und Kreativität gelassen, was ich sehr zu schätzen weiß. Ich bin sehr froh, dass ich die letzten fünf Jahre der Erforschung von elektroaktiven Biofilmen widmen durfte und hoffe sehr, dass ich in meiner zukünftigen Arbeit weiterhin mit Biofilmen arbeiten darf.

Ich danke außerdem Bernd und Nils von der Forschungswerkstatt Elektrotechnik, die mir das Potential fachübergreifender Zusammenarbeit gezeigt haben.

Zudem danke ich meinen Student*innen dafür, dass sie mit mir zusammen gearbeitet haben und mir dabei mit Offenheit, Neugierde und Vertrauen begegnet sind - ich habe nicht nur versucht euch etwas beizubringen, ihr habt gleichermaßen mir wertvolle Lektionen über Betreuungsarbeit und Mentoring beibringen können.

Außerdem gilt mein Dank der gesamten Arbeitsgruppe für das freundliche Arbeitsklima und die familiäre Atmosphäre, in der aus Kolleg*innen Freund*innen wurden. Ich danke euch für die Hilfsbereitschaft, die Kompetenz, die vielen Feierabendbiere gegen den Frust - selbst für das allgegenwärtige (kreative) Chaos danke ich euch. Ich danke Tobi, dass er mir das Chip-Zepter vertrauensvoll überreicht hat; David dafür, dass er die Anfänge meiner Promotion betreut hat und wir zusammen den

Grundstein für die bioelektrochemische Plattform gelegt haben; Vicky und Anne, dass sie mich in der Gruppe so lieb willkommen heißen haben, wir viele leckere und ausgedehnte Mittagessen zusammen verbracht haben und wir nach all den Jahren immer noch so viel Kontakt haben; Milena, der besten HiWine, die man sich nur vorstellen kann; der Karlsruher “Kerngruppe“ Leonie, Lukas, Kerstin, Melanie, Jonas & Miriam, dass wir so tapfer den Umzug zusammen gemeistert haben und das Umzugschaos retrospektiv eigentlich auch eine echt lustige Zeit war. In Hamburg sind wir dann (glücklicherweise) auf Sigi und Petra getroffen. Ich danke euch beiden für das unfassbar herzliche Willkommenskomitee und dafür, dass ihr uns - egal ob im Labor oder bei bürokratischen Angelegenheiten - einfach bei allem wo es hakt so wunderbar unterstützt. Benni danke ich, dass er meinem Rat so vertrauensvoll gefolgt ist und mit nach Hamburg gezogen ist - es ist so schön, dass wir nach zehn Jahren plötzlich wieder zusammen im Labor standen, nur diesmal mit ein klein wenig mehr Expertise als damals im ersten Semester beim Sezieren von armen Kreaturen. Danke, dass du mir ein so guter Freund bist und hoffentlich genießen wir noch einige Boule- und Boulderpartien und auch einige Biere zusammen. Janek, ich danke dir insbesondere dafür, dass wir uns bei so manchem Frust gegenseitig aufgebaut und unterstützt haben und dass wir uns bei Erfolgen gegenseitig füreinander gefreut haben - ich bin so froh, dass wir zeitgleich promoviert haben. Vivi danke ich für ihre liebevolle Empathie und fast noch mehr dafür, dass wir zusammen das Surfen entdeckt haben. Nicht nur das Surfen, auch Jana und Claudi haben wir gefunden - ich danke euch, dass wir das Line-up feministischer machen und, dass ihr aus Berlin an mich geglaubt und mir zugejubelt habt.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Mikrofluidik- und Biofilm-Partner René - manche munkeln sogar, er wäre mein Work-Hubby. Ich bin richtig stolz, was wir in den letzten Jahren alles erreicht haben und das ohne einen einzigen (ernsthaften)

Streit - manchmal sind wir uns vielleicht nur ein kleines winziges Bisschen auf die Nerven gegangen. Ich weiß extrem zu schätzen, wie sehr du mich unterstützt und mir insbesondere im letzten Jahr versucht hast, im Hintergrund den Rücken freizuhalten. Danke für das produktive und witzige Zusammenarbeiten, aber auch für lustige Dart- und Raveabende und dafür, dass du mir so ein zuverlässiger Freund bist. Ich hoffe, dass "Klein, E, Wurst" auch in Zukunft noch zusammen die Wissenschaft unsicher machen werden.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie, die immer an mich geglaubt hat und mich immer unterstützt hat, egal wie weit ich von zu Hause entfernt war. Danke Papa, dass du immer verstehen möchtest, was ich genau tue und dabei stets mit Abstand mein größter Fan bist und mich immer vorn siehst. Danke Oma, Opa, Mama (und natürlich auch Fiete) - jeder Besuch in Tönning fühlt sich an wie ein erholsamer Kurzurlaub. Henni, dir muss ich witzigerweise nicht nur für deinen - nennen wir es mal "brüderlichen Support" - danken, sondern auch dafür, dass du sogar eine Zeit lang Teil des Teams warst und mit uns programmierbare Heizmatten, automatisierte FISH-Automaten und so manch' andere Innovationen entwickelt hast. Joey, dir danke ich dafür, dass du mein zweitgrößter Fan bist und dass wir die letzten fünf Jahre so gut aufeinander Acht gegeben haben - du bist sogar mit nach Hamburg gekommen und hast deine eigene Promotion im Homeoffice bearbeitet. Ich bin so stolz auf uns, dass wir diese turbulenten Jahre so gut zusammen gemeistert haben und freue mich auf viele weitere Jahre mit dir - hoffentlich mit ein klein bisschen weniger Frust und Stress und ein bisschen mehr Zeit für Fahrradtouren, Wanderungen, Busausflüge und was uns sonst noch so einfällt.

Ich freue mich auf die vor mir liegenden Jahre, die hoffentlich noch viel weitere spannende Wissenschaft für mich bereit halten!

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	i
Abstract	ii
Danksagung	iii
Abbildungsverzeichnis	xi
Tabellenverzeichnis	xiv
Abkürzungsverzeichnis	xvi
1 Einleitung	1
1.1 Extrazellulärer Elektronentransfer	1
1.1.1 Extrazellulärer Elektronentransfer bei <i>Shewanella oneidensis</i> .	2
1.1.2 Extrazellulärer Elektronentransfer bei <i>Geobacter sulfurreducens</i>	4
1.2 Bioelektrochemische Systeme	7
1.2.1 Mikrobielle Elektrolysezelle	8
1.3 Biofilme	10
1.3.1 Biofilmbildung bei <i>Shewanella oneidensis</i>	12
1.3.2 Biofilmbildung bei <i>Geobacter sulfurreducens</i>	15
1.3.3 Kultivierung von Biofilmen	16
1.4 Zielsetzung	18
2 Material und Methoden	20
2.1 Zellkultivierung	20
2.1.1 Mikroorganismen und Plasmide	20
2.1.2 Chemikalien, Gase und Enzyme	21

Inhaltsverzeichnis

2.1.3	Kulturmedien und allgemeine Handhabung	21
2.1.4	Cryokonservierung	25
2.2	Molekularbiologische Methoden	25
2.2.1	Isolation von Plasmid-DNA und Quantifizierung von Nukleinsäuren	25
2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion	26
2.2.3	Agarose-Gelelektrophorese und Aufreinigung	29
2.2.4	Quantifizierung von Nukleinsäuren	30
2.2.5	Sanger-Sequenzierung und bioinformatische Auswertung	30
2.2.6	Restriktion und Ligation	31
2.2.7	Herstellung kompetenter Zellen und Transformation	32
2.2.8	Konjugation und markerlose Modifikation von Genen in <i>Shewanella oneidensis</i>	33
2.3	Kultivierung und Analyse von Biofilmen	35
2.3.1	Mikrofluidische Plattform	35
2.3.1.1	Fertigung von mikrofluidischen Reaktoren	35
2.3.1.2	Plattform für eine multiparallele mikrofluidische Biofilmkultivierung	37
2.3.1.3	Herstellung von Ag/AgCl-Referenzelektroden	40
2.3.2	Optische Analysen	41
2.3.2.1	Biofilmbestimmung mittels optischer Kohärenztomographie	42
2.3.2.2	Zellviabilitätsassay	44
2.3.2.3	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	46
2.4	Mathematische Auswertungen und Graphen	49
2.4.1	Mathematische Auswertungen	49
2.4.2	Erstellung von Graphen	49

3	Ergebnisse	50
3.1	Untersuchung der Biofilmentwicklung einer mikrobiellen Modellgemeinschaft	50
3.1.1	Quantitative Analyse der Elektroaktivität von <i>S. oneidensis</i> - und <i>G. sulfurreducens</i> -Biofilmen sowie eines Cokultur-Biofilms	51
3.1.2	Eine FISH-Analyse zeigt ein spezifisches Verteilungsmuster der <i>S. oneidensis</i> - und <i>G. sulfurreducens</i> -Zellen	55
3.1.3	Untersuchung der Zellviabilität innerhalb eines <i>S. oneidensis</i> / <i>G. sulfurreducens</i> -Cokultur-Biofilms	57
3.2	Einfluss verschiedener genetischer Faktoren auf die Biofilmentwicklung von <i>Shewanella oneidensis</i>	58
3.2.1	<i>S. oneidensis</i> MR-1 $\Delta\lambda$ als Wirtstamm	59
3.2.2	Untersuchung von WbpA und WbpP als mögliche Faktoren für die Biofilmbildung bei <i>Shewanella oneidensis</i>	60
3.2.2.1	Einfluss der Überexpression von <i>wbpA</i> und <i>wbpP</i> auf die anoxische Biofilmbildung	61
3.2.2.2	Einfluss der Überexpression von <i>wbpA</i> und <i>wbpP</i> auf die Stromproduktion im bioelektrochemischen System	64
3.2.3	Systematische Untersuchung von BpfA, BpfG und AggA als Faktoren für die Biofilmbildung bei <i>Shewanella oneidensis</i> . .	65
3.2.3.1	Einfluss von BpfA, BpfG und AggA auf die Biofilmentwicklung unter oxischen Bedingungen	66
3.2.3.2	Einfluss von BpfA, BpfG und AggA auf die Biofilmentwicklung unter anoxischen Bedingungen	71
3.2.3.3	Einfluss von BpfA, BpfG und AggA auf die Stromproduktion	75

4 Diskussion	77
4.1 Aufklärung der Entwicklung von kooperativen Anoden-Biofilm-Strukturen	77
4.1.1 Eine <i>S. oneidensis</i> / <i>G. sulfurreducens</i> -Cokultur verhält sich anders, als von Einzelkulturversuchen zu erwarten wäre	78
4.1.2 Das Verteilungsmuster von <i>S. oneidensis</i> und <i>G. sulfurreducens</i> im Cokultur-Biofilm deutet auf einen direkten Interspezies-Elektronentransfer hin	81
4.1.3 Die Aktivität ist im Zentrum des Biofilms am höchsten	84
4.1.4 Zusammenfassende Erkenntnisse der Untersuchung kooperativer Anoden-Biofilm-Strukturen	85
4.2 WbpA, WbpP, BpfA, BpfG und AggA als Schalter für die Biofilmentwicklung	86
4.2.1 Die Reduktion des EPS-Gehalts soll den Elektronentransfer in <i>S. oneidensis</i> MR-1 $\Delta\lambda$ erleichtern	87
4.2.2 WbpA und WbpP als Schalter für die Biofilmbildung bei <i>S. oneidensis</i>	88
4.2.2.1 Die Überexpression von <i>wbpA</i> und <i>wbpP</i> führt zu signifikanten Veränderungen der Biofilmeigenschaften	89
4.2.2.2 Vermutlich ist die SpeC-abhängige Überproduktion von WbpAP der Grund für die erhöhte Stromproduktion durch Riboflavin-basiertes Quorum Sensing	91
4.2.3 BpfA, BpfG und AggA als Schalter für die Biofilmbildung bei <i>S. oneidensis</i>	93
4.2.3.1 Übergeordnete Mechanismen bestimmen die Biofilmbildung unter oxischen Bedingungen bei <i>S. oneidensis</i>	94
4.2.3.2 Unter anoxischen Bedingungen wurden robuste Biofilme unterschiedlichster Architekturen gebildet . . .	95

Inhaltsverzeichnis

4.2.3.3	Zusammenhang zwischen Biofilmarchitektur und Strom- dichte ist komplexer als erwartet	97
4.2.4	Zusammenfassende Erkenntnisse bezüglich WbpA, WbpP, AggA, BpfA und BpfG	99
4.3	Ausblick	102
Literaturverzeichnis		xviii
Anhang		xli

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schema des Proteinnetzwerks für den extrazellulären Elektronentransfer (EET) bei <i>Shewanella oneidensis</i>	3
Abb. 2	Schema des Proteinnetzwerks für den extrazellulären Elektronentransfer (EET) in <i>Geobacter sulfurreducens</i> (Klein <i>et al.</i> , 2023).	5
Abb. 3	Schematische Darstellung der mikrobiellen Brennstoffzelle (MBZ) und der mikrobiellen Elektrolysezelle (MEZ).	9
Abb. 4	Modell der Biofilmentwicklung abgeändert nach Sauer <i>et al.</i> (2022).	10
Abb. 5	Modell für den regulatorischen Mechanismus zur Ausbildung eines extrazellulären Proteinnetzwerks in <i>Shewanella oneidensis</i> , vorgeschlagen von Zhou <i>et al.</i> (2015).	14
Abb. 6	Technische Zeichnung eines mikrofluidischen Reaktors.	36
Abb. 7	Messingform zur Fertigung von mikrofluidischen PDMS-Reaktoren.	36
Abb. 8	Zwei verschiedene beispielhafte mikrofluidische Reaktoren.	37
Abb. 9	Versuchskammern zur Kultivierung von mikrofluidischen Fließzellen.	38
Abb. 10	Robotische Plattform für eine multiparallele mikrofluidische Biofilmkultivierung.	39
Abb. 11	Techniken zur optischen Untersuchung von Biofilmstrukturen in verschiedenen Maßstäben nach Wagner <i>et al.</i> (2010).	41
Abb. 12	Anodische Biofilmentwicklung von <i>S. oneidensis</i> , <i>G. sulfurreducens</i> und einer <i>S. oneidensis</i> / <i>G. sulfurreducens</i> -Cokultur im Vergleich.	52
Abb. 13	Weitergehende Biofilmanalysen von <i>G. sulfurreducens</i> und einer <i>S. oneidensis</i> / <i>G. sulfurreducens</i> -Cokultur.	54

Abb. 14	Quantitative Ergebnisse einer räumlich aufgelösten FISH-Analyse eines <i>S. oneidensis</i> / <i>G. sulfurreducens</i> -Biofilms.	55
Abb. 15	Räumlich aufgelöste FISH-Analyse eines <i>S. oneidensis</i> / <i>G. sulfurreducens</i> -Biofilms.	56
Abb. 16	Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung von anodischen <i>S. oneidensis</i> / <i>G. sulfurreducens</i> -Cokultur-Biofilmen.	58
Abb. 17	Einfluss der Deletion des Lambda-Phagen auf die Biofilmbildung von <i>S. oneidensis</i> unter kontinuierlichen Flussbedingungen. . . .	59
Abb. 18	Qualitative Analyse des Einflusses der <i>wbpA</i> -, <i>wbpP</i> - sowie der <i>wbpAP</i> -Überexpression auf die Biofilmbildung von <i>S. oneidensis</i> unter anoxischen Bedingungen mit Fumarat als Elektronenakzeptor.	62
Abb. 19	Quantitative Analyse des Einflusses der <i>wbpA</i> -, <i>wbpP</i> - sowie <i>wbpAP</i> -Überexpression auf die Biofilmbildung von <i>S. oneidensis</i> unter anoxischen Bedingungen.	63
Abb. 20	Einfluss der Überexpression von <i>wbpA</i> , <i>wbpP</i> sowie der Co-Überexpression beider Gene auf die mittlere Stromdichte in mikrofluidischen MEZ.	64
Abb. 21	Qualitative Analyse des Einflusses von BpfA, BpfG und AggA auf die Biofilmbildung von <i>S. oneidensis</i> unter oxischen Bedingungen mit Laktat als Elektronendonator.	67
Abb. 22	Einfluss von <i>bpfG</i> (C116S) sowie der Überexpression von <i>bpfA</i> auf die Biofilmbildung von <i>S. oneidensis</i> unter oxischen Bedingungen.	69
Abb. 23	Einfluss der <i>aggA</i> -Überexpression auf die Biofilmbildung von <i>S. oneidensis</i> unter oxischen Bedingungen.	70
Abb. 24	Qualitative Analyse des Einflusses von BpfA, BpfG und AggA auf die Biofilmbildung von <i>S. oneidensis</i> unter anoxischen Bedingungen mit Fumarat als Elektronenakzeptor.	72

Abb. 25	Einfluss von <i>bpfG</i> (C116S) sowie der Überexpression von <i>bpfA</i> auf die Biofilmbildung von <i>S. oneidensis</i> unter anoxischen Bedingungen.	73
Abb. 26	Einfluss der <i>aggA</i> -Überexpression auf die Biofilmbildung von <i>S. oneidensis</i> unter anoxischen Bedingungen.	74
Abb. 27	Einfluss von <i>bpfG</i> (C116S) sowie der Überexpression von <i>bpfA</i> und <i>aggA</i> auf die mittlere Stromdichte in mikrofluidischen bioelektrochemischen Reaktoren.	75
Abb. 28	Stromdichte gegen das Biovolumen einer <i>G. sulfurreducens</i> - und einer <i>S. oneidensis</i> / <i>G. sulfurreducens</i> -Cokultur im Vergleich. .	80
Abb. 29	Von WbpA und WbpP katalysierte Reaktionen in <i>S. oneidensis</i> .	90

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Liste der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.	20
Tab. 2	Zusammensetzung der LB-Medien.	21
Tab. 3	Komplementationslösungen, welche im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.	22
Tab. 4	Zusammensetzung der Spurenelementlösung (100X).	22
Tab. 5	Zusammensetzung des M4-Mediums.	22
Tab. 6	Medien zur Kultivierung von <i>S. oneidensis</i> basierend auf M4- Medium.	23
Tab. 7	Zusammensetzung der Vitaminlösung (1000X).	23
Tab. 8	Zusammensetzung der NB-Spurenelementlösung (100X).	23
Tab. 9	Zusammensetzung der Selenit-Wolframat-Lösung (1000X).	24
Tab. 10	Zusammensetzung des Grundmediums zur Kultivierung von <i>G. sul-</i> <i>furreducens</i>	24
Tab. 11	Medien basierend auf dem Grundmedium zur Kultivierung von <i>G. sulfurreducens</i> (siehe Tab. 10).	24
Tab. 12	Zusammensetzung der PCR-Ansätze für jeweils 15 µl.	26
Tab. 13	Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (Primer).	27
Tab. 14	Übersicht über verwendete PCR-Protokolle.	29
Tab. 15	Zusammensetzung des TAE-Puffers (50X).	30
Tab. 16	Zusammensetzung des Ladepuffers (6X).	30
Tab. 17	Zusammensetzung eines Restriktionsansatzes.	31
Tab. 18	Zusammensetzung der Stammlösung (5X) für Ligationsansätze.	32

Tabellenverzeichnis

Tab. 19	Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur isothermalen <i>in-vitro</i> -Ligation nach Gibson.	32
Tab. 20	Zusammensetzung der phosphatgepufferten Salzlösung (PBS, 10X).	44
Tab. 21	Hybridisierungspuffer für Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH).	47
Tab. 22	Waschpuffer für Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH).	47
Tab. 23	Zusammensetzung des Einbettpuffers.	47
Tab. 24	Protokoll für die automatisierte Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH).	48

Abkürzungsverzeichnis

AMP	Adenosin-Monophosphat
BES	Bioelektrochemisches System
c-di-GMP	<i>Cyclic diguanylate mono phosphate</i> , zyklisches Diguanylatmonophosphat
CLSM	<i>Confocal laser scanning microscope</i> , konfokales Laser-Scanning-Mikroskop
DAP	2,6-Diaminopimelinsäure
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DET	Direkter Elektronentransfer
DIET	Direkter Interspezies-Elektronentransfer
eDNA	Extrazelluläre DNA
EET	Extrazellulärer Elektronentransfer
EPS	Extrazelluläre polymere Substanzen
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
FMN	Flavin-Mono-Nukleotid
MBZ	Mikrobielle Brennstoffzelle
MES	Mikrobielles elektrochemisches System
MEZ	Mikrobielle Elektrolysezelle
OCT	<i>Optical coherence tomography</i> , optische Kohärenztomographie
OCV	<i>Open circuit voltage</i> , Leerlaufspannung
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PDMS	Polydimethylsiloxan

Abkürzungsverzeichnis

qPCR	<i>Real-time quantitative PCR</i> , quantitative Echtzeit-PCR
rpm	<i>Rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
SHE	<i>Standard hydrogen electrode</i> , Standardwasserstoffelektrode
TISS	Typ-I-Sekretionssystem

1 Einleitung

Die Erkenntnis, dass Mikroorganismen Elektronen direkt auf Elektroden übertragen können, ohne dass exogene Mediatoren zur Förderung der Elektronenübertragung hinzugeführt werden müssen (Bond *et al.*, 2002; Bond und Lovley, 2003; Kim *et al.*, 1999), hat zur Entwicklung bioelektrochemischer Systeme (BES) geführt (Lovley, 2008; Logan, 2009). BES wandeln chemische in elektrische Energie um oder umgekehrt und wenn mikrobielle Organismen als Katalysatoren eingesetzt werden, bezeichnet man sie als mikrobielle elektrochemische Systeme (MES). Allerdings sind diese Systeme aufgrund ihrer zu geringen Energieausbeuten derzeit nicht wettbewerbsfähig mit konventionellen Systemen. Optimierungen werden oft nur auf eindimensionale Weise betrachtet. Ein multidisziplinärer Ansatz mit einer systematischen multidimensionalen Analyse der Mikroorganismen-Elektroden-Schnittstelle könnte der Ausgangspunkt sein, der einen entscheidenden Schritt näher an eine industrielle Anwendung mikrobieller elektrochemischer Systeme heranzuführt.

1.1 Extrazellulärer Elektronentransfer

Exoelektrogene Mikroorganismen sind in der Lage, respiratorisch anfallende Elektronen auf unlösliche, extrazelluläre Elektronenakzeptoren wie beispielsweise Eisenverbindungen zu übertragen. Der extrazelluläre Elektronentransfer (EET) ist Teil des anaeroben Stoffwechsels von exoelektrogenen Mikroorganismen (Lovley, 2006; Logan, 2009). Hierbei werden Elektronen von Elektronendonoren mit niedrigem Redoxpotential durch eine Reihe von Redoxreaktionen auf Akzeptoren mit einem positiveren Redoxpotential übertragen. Prinzipiell lassen sich die bakteriellen Elektronentransfermechanismen in zwei Gruppen einteilen: (I) den direkten Elektronentransfer (DET)

durch membrangebundene Cytochrome oder sogenannte Nanowire und (II) den vermittelten Elektronentransfer durch Elektronen-Shuttle-Moleküle (Haddock und Schairer, 1973; Logan *et al.*, 2006; Beegle und Borole, 2018; Reguera, 2018; Light *et al.*, 2018; Lovley, 2017b; Lovley, 2017a). Es ist erwähnenswert, dass es nicht nur elektroaktive Prokaryoten, sondern auch Archaeen und sogar Eukaryoten mit dieser Fähigkeit gibt (Pillot *et al.*, 2018; Yilmazel *et al.*, 2018; Raghavulu *et al.*, 2011). Die am intensivsten untersuchten und auch am besten verstandenen Modellorganismen des EET sind jedoch die Proteobakterien *Geobacter sulfurreducens* und *Shewanella oneidensis*.

1.1.1 Extrazellulärer Elektronentransfer bei *Shewanella oneidensis*

Unser aktuelles Wissen über die Biochemie des EET basiert hauptsächlich auf Experimenten mit *S. oneidensis* und ist in Abb. 1 zusammengefasst. Aus dem Menaquinonpool stammende Elektronen werden über das an der Cytoplasmamembran lokalisierte *c*-Typ-Cytochrom CymA in das Periplasma übertragen (Gralnick und Newman, 2007). Anschließend überbrücken die löslichen Tetrahäm-Cytochrome FccA oder STC das Periplasma von der inneren zur äußeren Membran (Sturm *et al.*, 2015). Die Elektronentransportkette endet fast direkt an der Oberfläche der äußeren Membran mit den beiden Dekahäm-Cytochromen MtrC und OmcA. MtrC ist Teil eines heterotrimeren Komplexes mit dem Dekahäm-Cytochrom MtrA und dem β -Fass-Protein MtrB. Dieser MtrCAB-Komplex bildet eine leitfähige Pore durch die äußere Membran (Ross *et al.*, 2007; Hartshorne *et al.*, 2009; Edwards *et al.*, 2020). MtrC und OmcA enthalten zudem Flavin-Cofaktoren, die den terminalen Elektronentransferschritt zu beschleunigen scheinen und den Transport eines Elektrons durch die Bildung von Semichinonen erleichtern (Okamoto *et al.*,

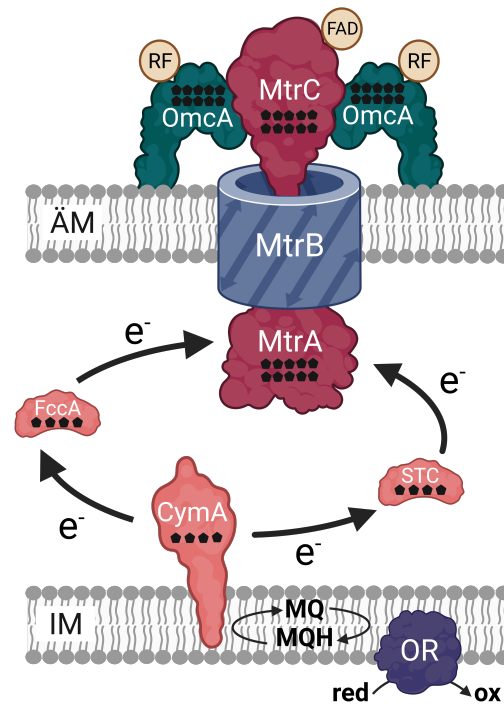


Abb. 1: **Schema des Proteinnetzwerks für den extrazellulären Elektronentransfer (EET) bei *Shewanella oneidensis* (Klein *et al.*, 2023).** Elektronen aus dem Menaquinonpool (MQ = oxidiert und MQH = reduziert) werden über CymA in der inneren Membran (IM) über FccA oder STC im Periplasma zur äußeren Membran (ÄM) transportiert. Die Elektronentransportkette endet mit OmcA und MtrC, wobei letzterer Teil eines heterotrimeren Komplexes mit MtrA und MtrB ist. Die schwarzen Pentagonsymbole zeigen die Anzahl der Häm-Cofaktoren in den *c*-Typ-Cytochromen an, FAD steht für Flavin-Adenin-Dinukleotid und RF für Riboflavin.

2013; Okamoto *et al.*, 2014a; Okamoto *et al.*, 2014b; Xu *et al.*, 2016). Darüber hinaus scheint überschüssiges Riboflavin im Medium (insbesondere unter Batch-Bedingungen) als Elektronen-Shuttle zu Elektronenakzeptoren in Zellnähe verwendet zu werden (Marsili *et al.*, 2008; Von Canstein *et al.*, 2008). Wie und wann der Flavin-Cofaktor an die membranständigen Cytochrome gebunden wird, ist noch nicht bekannt. Es wurde jedoch nachgewiesen, dass Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) über den spezifischen Transporter Bfe in das Periplasma transportiert wird (Kotloski und Gralnick, 2013). Im Periplasma wird zumindest ein Teil des FAD durch die periplasmatische 5'-Nukleotidase UshA in Flavin-Mono-Nukleotid (FMN) und Adenosin-Monophosphat (AMP) gespalten (Covington *et al.*, 2010).

Obwohl *S. oneidensis* der am besten untersuchte Modellorganismus für EET ist, sind die erreichbaren dissimilatorischen Eisenreduktionsraten und Stromdichten in BES verglichen mit *G. sulfurreducens* verhältnismäßig niedrig (Dolch *et al.*, 2014). Die allgemeine Annahme ist, dass *G. sulfurreducens* die Nische eines Spezialisten für anaerobe Atmung mit unlöslichen Elektronenakzeptoren ausfüllt, während *S. oneidensis* als Generalist anaerober Atmung bezeichnet werden kann, was durch die Fähigkeit unterstützt wird, mit einem der breitesten Spektren von nutzbaren Elektronenakzeptoren (einschließlich Sauerstoff) zu atmen, die bisher bekannt sind (Nealson und Scott, 2006; Heidelberg *et al.*, 2002; Tiedje, 2002).

1.1.2 Extrazellulärer Elektronentransfer bei *Geobacter sulfurreducens*

Ein Vergleich der biochemischen EET-Maschinerie von *S. oneidensis* und *G. sulfurreducens* zeigt, dass die Grundstrategie für den Elektronentransport zur Zelloberfläche relativ ähnlich ist. Auch bei *G. sulfurreducens* basiert der EET hauptsächlich auf einem Netzwerk von *c*-Typ-Cytochromen, welche die Distanz von der Cytoplasmamembran bis hin zur Zelloberfläche überbrücken (siehe Abb. 2). Das Gegenstück zu CymA in *Shewanella* sind die Nonahäm-*c*-Typ-Cytochrome ImcH und CbcL. Während CbcL verwendet wird, wenn der terminale Elektronenakzeptor ein Redoxpotential $\leq -0,1$ V gegenüber einer Standardwasserstoffelektrode (SHE) hat, wird ImcH für Elektronenakzeptoren mit einem höheren Redoxpotential verwendet (Levar *et al.*, 2014; Zacharoff *et al.*, 2016). Außerdem wird auch in *G. sulfurreducens* der Elektronentransfer durch das Periplasma über ein lösliches *c*-Typ-Cytochrom, PpcA, vermittelt (Lloyd *et al.*, 2003). An der äußeren Membran können verschiedene multimere Komplexe für den Elektronentransfer genutzt werden, wobei der Elektronentransfer in BES hauptsächlich auf ExtABCD beruht (Otero *et al.*, 2018).

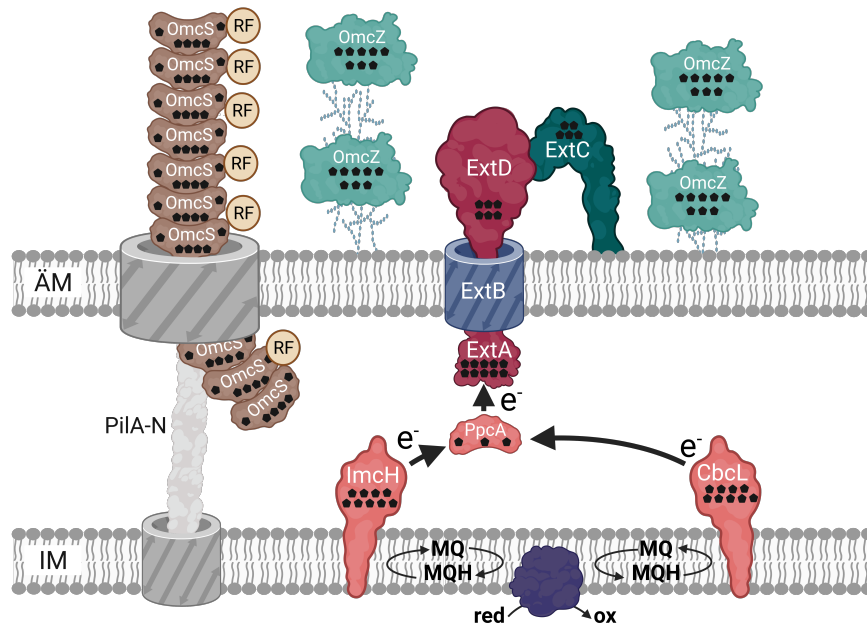


Abb. 2: **Schema des Proteinnetzwerks für den extrazellulären Elektronentransfer (EET) in *Geobacter sulfurreducens* (Klein *et al.*, 2023).** Ein Netzwerk aus *c*-Typ-Cytochromen überbrückt die Distanz von ImcH und CbcL in der inneren Membran (IM) über periplasmatisches PpcA bis zur äußeren Membran (ÄM), wo insbesondere der multimere ExtABCD-Komplex wichtig ist. Außerdem ist die Elektronentransferkette über die Zelloberfläche hinaus, vermittelt durch sogenannte Nanowire, verlängert. Schwarze Pentagonsymbole zeigen die Anzahl der Häm-Cofaktoren der *c*-Typ-Cytochrome an und RF steht für Riboflavin. MQ stellt die oxidierte und MQH die reduzierte Form des Menaquinonpools dar.

Der wichtigste Unterschied der Elektronentransferstrategien zwischen den beiden Organismen scheint die Verlängerung der Elektronentransferkette über die Zelloberfläche hinaus bei *G. sulfurreducens* zu sein. *G. sulfurreducens* ist in der Lage Atmungselektronen über große Entfernungen von mehreren Mikrometern entlang von Netzwerken aus Proteinfilamenten zu transportieren (Reguera *et al.*, 2005; Lovley und Walker, 2019). Diese Proteinfilamente werden als Nanowire bezeichnet und der erste Hinweis darauf, dass Nanowire und Elektronenübertragung miteinander verbunden sind, konnte durch Reguera *et al.* (2005) erbracht werden. Hier konnte gezeigt werden, dass eine Insertionsdeletion des pilA-N-Pilin-Gens (GSU1496) innerhalb des Typ-IV-Pili-Operons zur Elimination der meisten Filamente führte und zudem das Wachstum sowohl mit Eisenoxiden als auch mit Elektroden beeinträchtigte. Der

Mechanismus der extrazellulären Elektronenübertragung in *Geobacter*-Biofilmen ist nach wie vor umstritten und führt zu intensiven Diskussionen (Strycharz-Glaven *et al.*, 2012; Malvankar *et al.*, 2012d; Lovley, 2023; Bonanni *et al.*, 2012). Insbesondere zwei Theorien zum Aufbau und zur Funktionsweise der Nanowire sind Gegenstand aktueller Diskussion. Zum einen wurde eine metallähnliche Leitfähigkeit basierend auf einer π -Stapelung aromatischer Aminosäurereste in Pilin postuliert (Malvankar *et al.*, 2015; Lovley und Walker, 2019; Lovley, 2006; Reguera *et al.*, 2006; Reguera *et al.*, 2005; Malvankar *et al.*, 2011). Die Hypothese, dass es sich bei den Nanowire um leitfähige Filamente handelt, die aus einer einzigen Pilin-Untereinheit (PilA-N) bestehen, wurde in zahlreichen Arbeiten untersucht (Lovley, 2012a; Lovley, 2017b; Lovley und Walker, 2019; Lovley, 2012b; Lovley und Holmes, 2020; Lovley und Yao, 2021; Malvankar und Lovley, 2014). Die entgegenstehende Theorie hingegen geht von einem Springen der Elektronen zwischen *c*-Typ-Cytochromen (*superexchange model*) durch eine Abfolge von Redoxreaktionen in der extrazellulären Matrix aus (EZM; Strycharz-Glaven *et al.*, 2011; Schrott *et al.*, 2011; Bond *et al.*, 2012; Bonanni *et al.*, 2012). Den Pili selbst kommt hier eher eine strukturelle Rolle zu, indem sie die Cytochrome in der Biofilmmatrix anordnen und dadurch den Elektronentransferprozess verbessern sollen (Bond *et al.*, 2012; Strycharz-Glaven *et al.*, 2011; Bonanni *et al.*, 2012; Schrott *et al.*, 2011). Es wurde sowohl berichtet, dass OmcS-Cytochrome an die Pili gebunden werden (Leang *et al.*, 2010) als auch, dass die Pili selber aus gestapelten OmcS-Molekülen bestehen (Wang *et al.*, 2019). Die ursprüngliche Annahme, dass *G. sulfurreducens* Nanowire von den Typ-IV-Pilus-Untereinheiten gebildet werden, könnte daher kommen, dass der Export von OmcS auf der Typ-IV-Pilus-Produktionsmaschinerie basiert (Gu *et al.*, 2021). Weiterhin wurde gezeigt, dass das Oktahäm-*c*-Typ-Cytochrom OmcZ in der extrazellulären Polymersubstanz des Organismus lokalisiert ist (Rollefson *et al.*, 2011). Später wurde dann berichtet, dass es sowohl Nanowire aus gestapelten OmcS- als auch OmcZ-

Molekülen gibt, wobei die OmcZ-Nanowire eine 1000-fach erhöhte Konduktivität im Vergleich zu den OmcS-basierten Filamenten aufweisen sollen (Yalcin und Malvankar, 2020). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die bisher gesammelten Beweise nicht schlüssig sind, um entweder die ausschließliche Rolle der Cytochrome oder der Pili beim EET zu belegen. Es scheint jedoch ein breiter Konsens darüber zu bestehen, dass sowohl PilA als Typ-IV-Untereinheit als auch mit der äußeren Membran assoziierte *c*-Typ-Cytochrome grundlegend für hohe Stromdichten und den extrazellulären Langstrecken-Elektronentransfer sind.

Obwohl mit *Geobacter*-Spezies bisher die höchsten Energieausbeuten in MES erzielt werden konnten (Lovley *et al.*, 2011; Malvankar *et al.*, 2012b; Logan *et al.*, 2019), gehören ihr aerotoleranter bis obligat anaerober Stoffwechsel (Lin *et al.*, 2004) und die schlechte genetische Zugänglichkeit zu den Gründen für ihre mangelnde Eignung zur Verwendung im industriellen Maßstab. Ein Lösungsansatz besteht darin zu verstehen, warum *Geobacter* so viel höhere Elektronentransferraten mit extrazellulären Elektronenakzeptoren erzielen kann als *S. oneidensis*. Dieses Wissen könnte dann genutzt werden, um mit *S. oneidensis* ähnliche Energieausbeuten zu erreichen. *S. oneidensis* weist einen fakultativ anaeroben Stoffwechsel auf und ist genetisch sehr gut zugänglich (Corts *et al.*, 2019; Cao *et al.*, 2019), sodass bei erfolgreicher Steigerung der Energieausbeute eine industrielle Anwendung realistisch wird.

1.2 Bioelektrochemische Systeme

Exoelektrogene Mikroorganismen sind in der Lage, respiratorisch anfallende Elektronen auf unlösliche, extrazelluläre Elektronenakzeptoren wie beispielsweise Ei-

senverbindungen zu übertragen. Die Fähigkeit exoelektrogener Mikroorganismen Elektronenakzeptoren außerhalb der Zelle zu nutzen, wird in bioelektrochemischen Systemen (BES) ausgenutzt. BES wandeln chemische in elektrische Energie um oder umgekehrt. Diese in sich geschlossenen Systeme können in einen Anoden- und einen Kathodenbereich aufgeteilt werden. Werden mikrobielle Organismen als Katalysatoren verwendet, spricht man von mikrobiellen elektrochemischen Systemen (MES). Je nach Richtung des Elektronenflusses werden MES meist in anodische und kathodische Systeme unterteilt. So können MES zum einen dazu eingesetzt werden, einen reduktiven Strom zum Antrieb eines katalytischen Prozesses auf der Kathodenseite zu verwenden. Hier können z. B. autotrophe Mikroorganismen für Produktionsprozesse auf der Basis von Kohlendioxid als Substrat eingesetzt werden (kathodisches System). Andererseits können MES auch dazu verwendet werden, einen positiven Elektronenstrom zu ernten, der zur Anode fließt (anodisches System).

1.2.1 Mikrobielle Elektrolysezelle

Die mikrobielle Elektrolysezelle (MEZ) stellt eine Unterform anodischer MES dar. In anodischen MES oxidieren Mikroorganismen organische und/oder anorganische Substrate (Elektronendonator) und übertragen die erzeugten Elektronen auf die Anode (Elektronenakzeptor), während die Protonen an den Elektrolyten abgegeben werden. Die Elektronen fließen durch einen Kreislauf entweder über einen externen elektrischen Widerstand (mikrobielle Brennstoffzelle (MBZ), siehe Abb. 3a) oder über eine externe Stromzufuhr (MEZ, siehe Abb. 3b) zur Kathode (Kadier *et al.*, 2019; Kadier *et al.*, 2016; Simonte *et al.*, 2019). In einer MBZ wird die Spannung, die aus der Oxidation des Substrats an der Anode und der kathodischen Reaktion resultiert, zur Erzeugung eines elektrischen Stroms genutzt, ohne dass zusätzlich externe Energie oder Strom

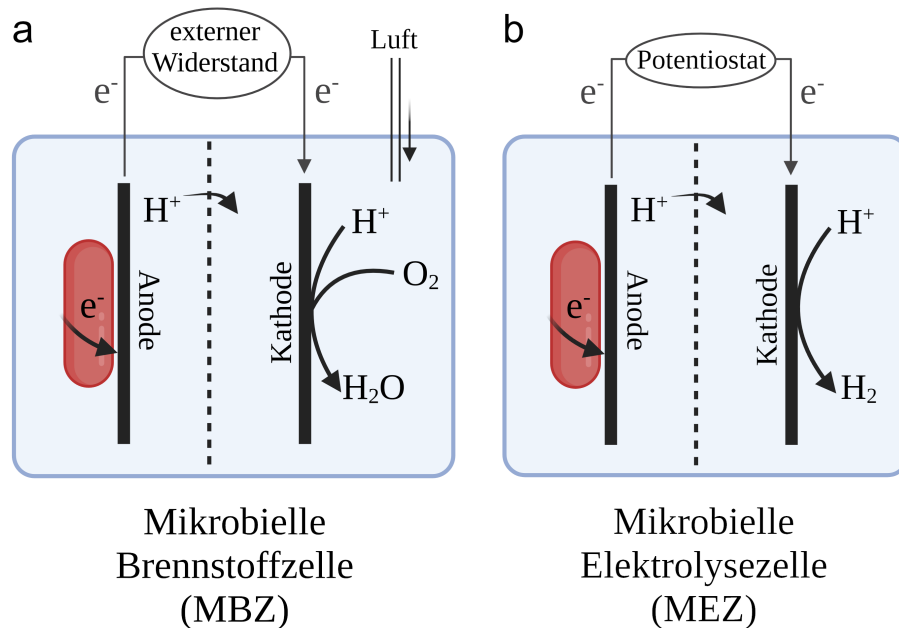


Abb. 3: **Schematische Darstellung der mikrobiellen Brennstoffzelle (MBZ, a) und der mikrobiellen Elektrolysezelle (MEZ, b).** Mikroorganismen wachsen hauptsächlich in Form eines Biofilms auf der Anode und übertragen ihre Elektronen auf die Elektrode. Während bei MBZ ein externer Widerstand Teil des elektrischen Stromkreises zwischen Bioanode und Kathode ist, ermöglicht bei MEZ eine zusätzliche Stromzufuhr die Produktion von Wasserstoff (H_2). Abbildung von Klein *et al.* (2023).

zugeführt wird. In den meisten Fällen wird Sauerstoff (O_2) an der Kathode reduziert, es können aber auch andere Elektronenakzeptoren verwendet werden (Ucar *et al.*, 2017). Im Gegensatz dazu werden MEZ mit einem zusätzlichen Potential versorgt, das ausreicht, um Protonen an der Kathode zu Wasserstoffgas zu reduzieren. Daher korreliert die Stromproduktion in MEZ direkt mit der Wasserstoffgasproduktion an der Kathode (Kadier *et al.*, 2019). Allen Systemen ist gemein, dass Mikroorganismen die anodischen Katalysatoren des jeweiligen Systems sind und normalerweise in Form eines Biofilms auf der Elektrode wachsen. Häufig werden die Elektrode und der Biofilm sogar als Komposit angesehen.

1.3 Biofilme

Exoelektrogene Bakterien sind die Katalysatoren von Bioelektrochemisches System (BES), wobei normalerweise die Minderheit der Mikroorganismen planktonisch im Elektrolyten vorkommt, während der Großteil direkt auf der Elektrode als elektroaktiver Biofilm wächst. Die Zellen eines Biofilms sind in eine selbstproduzierte Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eingebettet und haften aneinander und/oder an einer Oberfläche (Vert *et al.*, 2012). Das aktualisierte Modell zur Biofilmbildung von Sauer *et al.* (2022) beinhaltet drei grundlegende Ereignisse der Biofilmbildung: Aggregation, Wachstum und Disaggregation (siehe Abb. 4). Zunächst aggregieren die Bakterien untereinander oder heften sich an biotische sowie abiotische

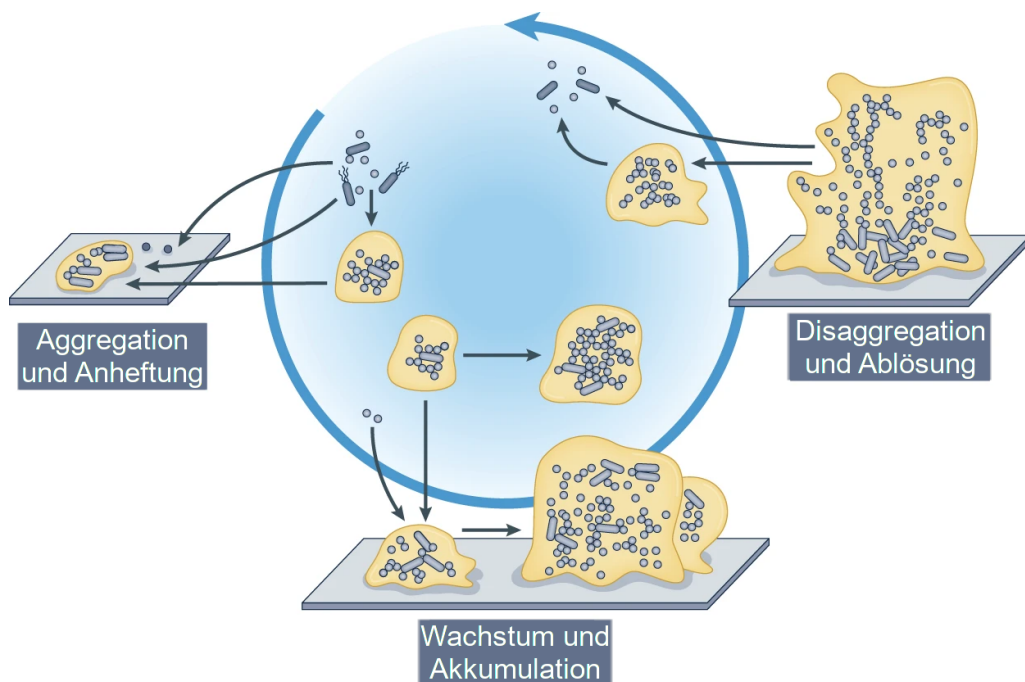


Abb. 4: **Modell der Biofilmentwicklung abgeändert nach Sauer *et al.* (2022).** Dieses aktualisierte Modell ist deutlich flexibler als ältere Modelle und umfasst drei grundlegende Ereignisse der Biofilmbildung: Aggregation, Wachstum und Disaggregation. Somit berücksichtigt dieses Modell sowohl oberflächenassoziierte (äußerer Ring) als auch nicht-oberflächenassoziierte (innerer Ring) Biofilme mit einem möglichen Austausch zwischen den beiden.

Oberflächen an. Anschließend expandieren die aggregierten und angehefteten Bakterienkolonien durch Wachstum sowie Rekrutierung von Zellen aus der Umgebung. Schließlich können die Bakterien den Biofilm je nach Mechanismus als Aggregate oder einzelne Zellen wieder verlassen. Dieses Modell ist weniger starr als das klassische 5-Stufen-Modell (Stoodley *et al.*, 2002) und umfasst sowohl oberflächenassoziierte als auch nicht-oberflächenassoziierte Biofilme mit einem möglichen Austausch zwischen den beiden.

Die Verwendung elektroaktiver Biofilme als Katalysatoren in MES hat eine Vielzahl von Vorteilen gegenüber planktonischer Zellmasse, insbesondere die hohe Widerstandsfähigkeit von Biofilmen gegenüber rauen und/oder wechselnden Umweltbedingungen. Zu rauen Bedingungen können hohe Strömungsgeschwindigkeiten (Scherkräfte), toxische oder wachstumshemmende Substanzen, hohe oder schwankende Substratkonzentrationen und besonders schnelle Änderungen der Prozessbedingungen im Allgemeinen gehören (Flemming *et al.*, 2016; Yin *et al.*, 2019; Brunner *et al.*, 2019; Härrer *et al.*, 2023). Biofilme beherbergen eine große Anzahl von Zellen mit Dichten von 10^8 bis 10^{11} Zellen g^{-1} Nassgewicht (Morgan-Sagastume *et al.*, 2008; Balzer *et al.*, 2010). Diese Immobilisierung vieler Zellen in einem kleinen Volumen ist ein wesentlicher Vorteil, insbesondere für biotechnologische Anwendungen im industriellen Maßstab (Edel *et al.*, 2019). Außerdem ermöglichen Biofilme einen dynamischen Nährstoffaustausch und vereinfachen die zelluläre Kommunikation (Costerton *et al.*, 1995; Donlan, 2002). Innerhalb der Biofilmmatrix können sich stabile Gradienten von Substraten und Produkten bilden, die zu einer Differenzierung und Anpassung der Physiologie der Mikroorganismen an die spezifischen Bedingungen innerhalb des Biofilms führen können (Flemming *et al.*, 2016).

1.3.1 Biofilmbildung bei *Shewanella oneidensis*

Die Anpassung an häufig wechselnde Umweltbedingungen ist für Bakterien entscheidend und ein maßgeblicher Faktor für die Ausbildung eines Biofilms (Parrilli *et al.*, 2022). Die Anpassungsmechanismen werden hierbei durch sekundäre Botenstoffe reguliert. In gramnegativen Bakterien und somit auch in *S. oneidensis* stellt insbesondere zyklisches di-Guanosinmonophosphat (c-di-GMP) ein wichtiges Signalmolekül dar (Ruhhal und Kataria, 2021; Hu *et al.*, 2021; Thormann *et al.*, 2006). c-di-GMP ist ein Triggermolekül für die Biofilmbildung und sein Abbau führt zur Auflösung eines Biofilms (Hengge, 2009; Mukherjee *et al.*, 2020). In *Shewanella* spp. vermittelt c-di-GMP die Biofilmbildung, indem es mit Enzymen der Polysaccharid-Biosynthese, wie z. B. der MxdB-Glykosyltransferase, interagiert, um die Biosynthese von extrazellulären Polysacchariden zu aktivieren (Gambari *et al.*, 2019). Frühere Studien haben zudem gezeigt, dass der auf c-di-GMP reagierende Transkriptionsfaktor FlrA die Expression von Genen für die Geißelsynthese sowie des Adhäsionsproteins BpfA kontrolliert (Gao *et al.*, 2018; Cheng *et al.*, 2020). Neben der Vermittlung der Biofilmentwicklung konnte außerdem gezeigt werden, dass das c-di-GMP-Signalnetzwerk die Expression von c-Typ-Cytochromen wie CymA, OmcA und MtrCAB reguliert (Ng *et al.*, 2020). Somit stellt c-di-GMP ein wichtiges Signalmolekül bei *S. oneidensis* sowohl für die Biofilmbildung als auch für die Expression von EET-relevanten Genen dar.

Die Biofilmbildung von *S. oneidensis* ist unter oxidischen Bedingungen gut untersucht. Bei der initialen Anheftung von *S. oneidensis* nehmen das funktionelle Geißelsystem, das Mannose-sensitive Hämagglutinations-Typ-IV-Pilus-System sowie extrazelluläre DNA (eDNA) eine wichtige Rolle ein (Gödeke *et al.*, 2012; Gödeke *et al.*, 2011; Thormann *et al.*, 2004). Die Maturation von einer Einzelschicht an Zellen zu

einer dreidimensionalen Biofilmstruktur beinhaltet das bereits erwähnte *mxrABCD*-Gencluster, welches die Biosynthese von extrazellulären Polysacchariden reguliert (Thormann *et al.*, 2006). Die Ab- oder Auflösung des Biofilms kann, getriggert durch eine Veränderung der Biofilmumgebung, passiv oder aktiv geschehen. Dabei beinhaltet die Ablösung von *S. oneidensis*-Zellen eine allgemeine Lockerung der Biofilmstruktur verbunden mit der Freisetzung einzelner Zellen oder Zellcluster (Thormann *et al.*, 2005).

Ein wichtiger Mechanismus der Biofilmbildung in *S. oneidensis*, aber auch in anderen Organismen, wird über ein extrazelluläres Proteinnetzwerk vermittelt, in welchem BpfA (*biofilm promoting factor*) das Schlüsselenzym darstellt. Zhou *et al.* (2015) haben in ihrem Modell die Hypothese aufgestellt, dass in planktonischen Zellen die Ausbildung eines Biofilms durch die Bindung von BpfA an BpfG verhindert wird (siehe Abb. 5). Binden intrazellulär c-di-GMP und periplasmatisch BpfG an BpfD, wird BpfA freigesetzt. Der Transport von BpfA zur äußeren Membran erfolgt vermutlich durch das Typ-I-Sekretionssystem (TISS) AggCBA. Extrazellulär fungiert BpfA als Zell-Zell-Verbinder und führt zur Ausbildung eines Biofilms. Sobald der intrazelluläre c-di-GMP-Spiegel sinkt und es zur Abspaltung von BpfD kommt, wird BpfG freigesetzt. BpfG ist ein bifunktionales Enzym, welches nicht nur für den Transport von BpfA notwendig ist, sondern zudem eine Proteinase-Aktivität aufweist. Ungebundenes BpfG spaltet BpfA, was zu einer Auflösung des Biofilms führt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass BpfG mit einer Punktmutation im katalytischen Zentrum des Proteaseteils zu einer Erhöhung der Biofilmbildung führt (Zhou *et al.*, 2015). In früheren Arbeiten konnte zudem gezeigt werden, dass die Überexpression der TISS-Komponente *aggA* ebenfalls zu einer erhöhten Biofilmbildung bei *S. oneidensis* führt (De Vriendt *et al.*, 2005; De Windt *et al.*, 2006; Theunissen *et al.*, 2009).

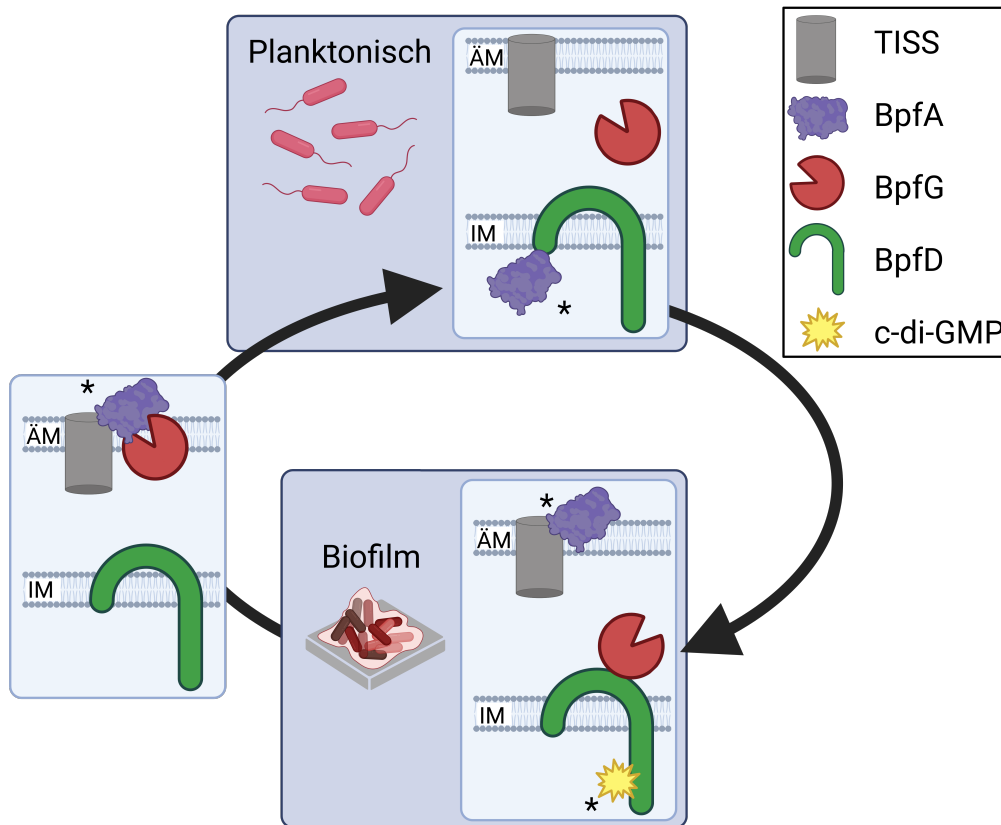


Abb. 5: **Modell für den regulatorischen Mechanismus zur Ausbildung eines extrazellulären Proteinnetzwerks in *Shewanella oneidensis*, vorgeschlagen von Zhou *et al.* (2015).** In planktonischen Zellen wird BpfA von BpfD gebunden. Sobald ein Signal (vermutlich zyklisches Diguanylatmonophosphat (c-di-GMP)) und BpfG an BpfD binden, wird BpfA entlassen und durch ein Typ-I-Sekretionssystem (TISS) exportiert. BpfA wird an die äußere Membran (ÄM) lokalisiert und Biofilm wird gebildet. Sobald das Signal ausbleibt, kommt es zum Entlassen von BpfG und wahrscheinlich wird dessen Proteinaseaktivität aktiviert. BpfA wird daraufhin abgebaut und der Biofilm löst sich auf. Die Sternchen markieren Positionen, die bisher nicht nachgewiesen wurden, sondern auf Spekulationen von Zhou *et al.* (2015) basieren. IM steht für innere Membran.

Überraschenderweise ist das Wissen über die Biofilmbildung von *S. oneidensis* unter anoxischen Bedingungen eingeschränkt, und es wird allgemein angenommen, dass Wildtyp-Stämme unter Ausschluss von Sauerstoff grundsätzlich dünne oder sogar nur einschichtige Biofilme bilden. Jedoch wurden bisher keine Studien veröffentlicht, die systematisch die Biofilmentwicklung unter oxischen und anoxischen Bedingungen untersuchen und miteinander vergleichen. Einen beschleunigenden Faktor der anoxischen Biofilmbildung konnten Edel *et al.* (2021) identifizieren, indem sie nachwiesen,

dass Riboflavin neben seiner Rolle als Elektronen-Shuttle und Cofaktor (siehe auch Abschnitt 1.1.1) zudem als *Quorum Sensing*-Molekül wirkt. Riboflavin induziert konzentrationsabhängig die Expression von *speC*, welches für eine Ornithin-Decarboxylase codiert. Ein erhöhter SpeC-Spiegel wiederum löst eine verstärkte Biofilmbildung aus. Der Mechanismus der SpeC-vermittelten Biofilmbildung konnte bisher nicht endgültig geklärt werden, scheint aber auf posttranskriptioneller Ebene zu erfolgen. Eine SpeC-Überexpression führte zu einer Reihe von differentiell regulierten Proteinen, darunter WbpP. Diese Uridindiphosphat-N-Acetylglucosamin-C4-Epimerase war das einzige Protein, welches eine direkte Funktion bei der EPS-Bildung hat und es konnte bei mehreren Mikroorganismen ein Zusammenhang zwischen diesem Protein und EPS-Produktion gezeigt werden (Lee *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2006). Ob und wie WbpP die anaerobe Biofilmbildung in *S. oneidensis* beeinflussen könnte, wurde jedoch bisher nicht experimentell untersucht.

1.3.2 Biofilmbildung bei *Geobacter sulfurreducens*

Im Gegensatz zu *S. oneidensis* beruht beinahe das gesamte Wissen über *G. sulfurreducens*-Biofilme auf BES-Experimenten und es gibt kaum systematische Untersuchungen mit anderen Elektronenakzeptoren. *Geobacter*-Biofilme weisen eine besonders elektroaktive EPS-Matrix mit einer großen Anzahl an Matrix-assoziierten *c*-Typ-Cytochromen und Nanowire auf, welche die Zellen für das Wachstum und die Elektronenübertragung auf Mineraloxide und Elektroden räumlich organisieren (siehe Abschnitt 1.1.2). Der Einfluss der unterschiedlichen Außenmembran-assoziierten *c*-Typ-Cytochrome auf die Elektroaktivität von Biofilmen wurde mittels Deletionsmutationen untersucht. Die Deletion von *omcE* oder *omcB* zeigte keinen Effekt auf die Stromproduktion in BES (Holmes *et al.*, 2006; Nevin *et al.*, 2009; Richter *et al.*, 2009).

Die Bedeutung von OmcS konnte noch nicht abschließend geklärt werden und es gibt sowohl Studien, die berichten, dass dieses Cytochrom keinen essentiellen Einfluss auf die Stromübertragung hat (Nevin *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2022; Malvankar *et al.*, 2012c), als auch Studien, die das Gegenteil annehmen (Filman *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019). Die Relevanz von *omcZ* hingegen ist weniger umstritten (Inoue *et al.*, 2011; Gu *et al.*, 2023) und eine Deletion führt zu einer signifikanten Reduktion der Elektroaktivität des Biofilms (Nevin *et al.*, 2009; Richter *et al.*, 2009). Zudem scheint sich OmcZ bevorzugt in der Nähe oder an der Elektrodenoberfläche ($< 10 \mu\text{m}$) innerhalb des anodischen Biofilms von *G. sulfurreducens* zu befinden (Inoue *et al.*, 2011), was auf eine kritische Rolle von OmcZ im letzten EET-Schritt schließen lässt. Wie bereits in Abschnitt 1.1 erläutert, besteht der Hauptunterschied in den Elektronenübertragungsstrategien von *S. oneidensis* und *G. sulfurreducens* in der Verlängerung des EET über die Zelloberfläche hinaus durch lange leitfähige Strukturen in *G. sulfurreducens*. Auch wenn der Aufbau und der Elektronenübertragungsweg der Nanowire bisher nicht abschließend geklärt werden konnte, sind Forschende sich einig, dass diese leitfähigen Strukturen der Hauptgrund für die Ausbildung der besonders dicken Biofilme von bis zu mehreren $100 \mu\text{m}$ Dicke (Babauta *et al.*, 2012; Malvankar *et al.*, 2012a; Reguera *et al.*, 2006; Dhar *et al.*, 2017; Renslow *et al.*, 2013) von *Geobacter*-Spezies sind.

1.3.3 Kultivierung von Biofilmen

Obwohl Biofilme die am weitesten verbreitete Form mikrobiellen Lebens darstellen und trotz ihrer enormen Wichtigkeit für biotechnologische Anwendungen, arbeitet ein Großteil der modernen Mikrobiologie und Biotechnologie immer noch mit suspendierten Mikroorganismen. Dies liegt hauptsächlich an der komplexen und zeitlich dynamischen Zusammensetzung von Biofilmen, was die Kultivierung, Manipulation, Analyse

sowie Modellierung erschwert. Wird in Veröffentlichungen von der Untersuchung eines Biofilms gesprochen, ist im einfachsten Fall sogar nur die Beurteilung der Kolonien auf Agarplatten gemeint (Ray *et al.*, 2012; Tepavčević *et al.*, 2022). Eine weitere häufig angewandte Methode ist das Kultivieren in Mikrotiterplatten, wobei nach der Inkubation zunächst die optische Dichte der Suspension gemessen, der Überstand anschließend verworfen und der eigentliche Biofilm mit einem Kristallviolettassay untersucht wird. Indem man die beiden optischen Dichten in ein Verhältnis zueinander setzt, können Rückschlüsse auf die Biofilmmenge gezogen werden (Theunissen *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2020; Shi *et al.*, 2019). Das Biofilmwachstum mit Hilfe dieser statischen Kultivierungsmethoden ist nicht vergleichbar mit dem Wachstum unter natürlichen Bedingungen und zudem stellen Analysen zumeist Endpunktanalysen dar. Es werden jedoch auch dynamischere Biofilmkultivierungsmethoden angewendet, wie z. B. modifizierte Robbin-Systeme oder *Drip-Flow*-Reaktoren (Crivello *et al.*, 2023; Azeredo *et al.*, 2017; Coenye und Nelis, 2010; Raad *et al.*, 2007; Heuschkel *et al.*, 2021). Diese bieten zwar kontinuierliche Durchflussbedingungen, aber die Analysemethoden sind weiterhin fast ausschließlich Endpunktanalysen. Dahingegen bieten mikrofluidische Systeme eine Möglichkeit für eine Kultivierung von Biofilmen unter Flussbedingungen bei gleichzeitiger nicht-destruktiver *in-situ*-Analyse (Hansen *et al.*, 2019; Pérez-Rodríguez *et al.*, 2022). Die Verwendung maßgeschneiderter Reaktoren sowie das Anlegen präziser Kultivierungsbedingungen ermöglichen es, den realen Bedingungen so nahe wie möglich zu kommen. Eine maschinelle Unterstützung reduziert außerdem die aktive Arbeitszeit, während die Reproduzierbarkeit signifikant erhöht werden kann (Hansen *et al.*, 2019). Ein kleinerer Maßstab erlaubt zudem die Durchführung von mehr Experimenten auf kleinerem Raum, was bei einer Reduktion der aktiven Arbeitszeit durch maschinelle Unterstützung zu einem Hochdurchsatz an Experimenten führt. Somit bieten mikrofluidische Systeme zahlreiche Vorteile für die Kultivierung und integrierte Analyse von Biofilmen.

BES sind gut untersuchte Systeme (Santoro *et al.*, 2017; Klein *et al.*, 2023), aber da es sich um multiskalige Anlagen mit biologischen Mikroobjekten als Katalysatoren handelt, sind sie komplex und ein fundamentales Verständnis der involvierten Prozesse wird durch die zahlreichen beteiligten Elemente erschwert. Eine Verkleinerung der BES-Reaktoren könnte diese Systeme vereinfachen, sodass Prozessparameter einfacher kontrolliert werden könnten, was ein präziseres und definierteres Untersuchen der beteiligten Prozesse ermöglichen würde. In der Tat sind bereits verschiedene mikrofluidische BES entwickelt worden (Pinck *et al.*, 2020; Zarabadi *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2016; Parkhey und Sahu, 2021; Yahyanezhad Gele *et al.*, 2023). Biofilmentwicklung und Stromproduktion werden hier jedoch nicht in direkte Beziehung zueinander gebracht. Eine konsistente Korrelation würde es ermöglichen, den Einfluss genetischer Faktoren auf die Stromproduktion systematisch zu untersuchen. Dies wäre ein Schritt in Richtung eines mehrdimensionalen und umfassenden Verständnis von EET, was wiederum dazu beitragen würde, BES zu optimieren und damit konkurrenzfähig zu konventionellen Systemen zu machen.

1.4 Zielsetzung

Mikrobielle elektrochemische Systeme (MES) stellen eine äußerst vielversprechende Alternative für eine nachhaltige Energieproduktion dar, sind jedoch derzeit aufgrund ihrer zu geringen Energieausbeuten nicht wettbewerbsfähig mit konventionellen Systemen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst untersucht werden, welche Energieausbeute mit *G. sulfurreducens*, dem Modellorganismus mit den bisher höchsten nachweisbaren Stromraten, in einer Modellgemeinschaft erzielt werden kann und wie die Biofilmentwicklung mit der Stromproduktion zusammenhängt. Um in der Lage zu sein, Biofilmentwicklung und Energieproduktion direkt miteinander

zu korrelieren, war es daher zunächst notwendig, eine Kultivierungsplattform zu etablieren, mit der elektroaktive Biofilme kultiviert und in Echtzeit *in-situ* überwacht werden können. *S. oneidensis* stellt aus mehrerlei Gründen den Organismus der Wahl für den künftigen Betrieb nachhaltiger MES dar. Aber obwohl es der am besten untersuchte Modellorganismus für EET ist, sind die erreichbaren dissimilatorischen Eisenreduktionsraten und Stromdichten in MES verglichen mit *G. sulfurreducens* verhältnismäßig niedrig. Diese Arbeit basiert auf der Forschungshypothese, dass dieser Unterschied vor allem in der konduktiveren EZM von *G. sulfurreducens* begründet liegt. Daher sollten im nächsten Teil dieser Arbeit der Einfluss verschiedener genetischer Faktoren auf die Biofilmentwicklung fundamental untersucht werden. Darüber hinaus sollte untersucht werden, wie weit die endogene Fähigkeit des Organismus, einen leitfähigen Biofilm auf einer Anode zu bilden, gesteigert werden kann und ob eine Korrelation zwischen bestimmten Biofilmparametern und der zu erwartenden Stromproduktion in einem BES feststellbar ist.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultivierung

2.1.1 Mikroorganismen und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in der nachfolgenden Tabelle 1 mit der jeweiligen Stammnummer, dem relevanten Genotypen sowie der entsprechenden Referenz aufgeführt.

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
JG22	<i>Escherichia coli</i> DH5 α ZI	Lutz und Bujard, 1997
JG98	<i>E. coli</i> WM3064	Dehio und Meyer, 1997
JG407	<i>G. sulfurreducens</i> PCA	Caccavo <i>et al.</i> , 1994
JG918	<i>S. oneidensis</i> MR-1 $\Delta\lambda$	Bursac <i>et al.</i> , 2017
JG1336	<i>E. coli</i> DH5 α pBAD_leer	Laura Philipp
JG1469	<i>S. oneidensis</i> MR-1 pBAD_leer	Edel <i>et al.</i> , 2021
JG1475	<i>S. oneidensis</i> MR-1 $\Delta\lambda$ pBAD_leer	Miriam Edel
JG1733	<i>E. coli</i> DH5 α pBAD_aggA	Diese Arbeit
JG1734	<i>E. coli</i> DH5 α pMQ_bpfG	Diese Arbeit
JG1735	<i>E. coli</i> DH5 α pMQ_P_bpfA	Diese Arbeit
JG1736	<i>S. oneidensis</i> MR-1 Δ bpfG	Diese Arbeit
JG1737	<i>S. oneidensis</i> MR-1 Δ P_bpfA	Diese Arbeit
JG1738	<i>S. oneidensis</i> MR-1 $\Delta\lambda$ bpfG (C116S)	Diese Arbeit
JG1739	<i>S. oneidensis</i> MR-1 $\Delta\lambda$ bpfA (P_cymA)	Diese Arbeit
JG1740	<i>E. coli</i> WM3064 pMQ_bpfG (C116S)	Diese Arbeit
JG1741	<i>E. coli</i> WM3064 pMQ_bpfA (P_cymA)	Diese Arbeit
JG1751	<i>E. coli</i> DH5 α pBAD_wbpAP	Miriam Edel
JG1758	<i>S. oneidensis</i> MR-1 $\Delta\lambda$ pBAD_aggA	Diese Arbeit
JG1861	<i>S. oneidensis</i> MR-1 $\Delta\lambda$ pBAD_wbpA	Diese Arbeit
JG1862	<i>S. oneidensis</i> MR-1 $\Delta\lambda$ pBAD_wbpP	Diese Arbeit
JG1863	<i>S. oneidensis</i> MR-1 $\Delta\lambda$ pBAD_wbpAP	Diese Arbeit

2.1.2 Chemikalien, Gase und Enzyme

Sämtliche verwendete Chemikalien und Gase wurden von Westfalen AG (Münster), AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Promega (Mannheim), Roche Diagnostics (Mannheim), Carl Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma Aldrich (Deisenhof) bezogen.

2.1.3 Kulturmedien und allgemeine Handhabung

Zum Ansetzen aller Medien und Puffer wurde Reinstwasser (PURELAB Plus, Veolia Water Technologies Deutschland, Celle) verwendet (siehe Tab. 2-11). Diese wurden im Anschluss 20 Minuten bei 121 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert. Anoxische Medien wurden in einer mit Septum verschlossenen Flaschen für mindestens 30 Minuten durch sich wiederholende Zyklen von Begasung (N₂ oder 80 % N₂/20 % CO₂) und Vakuum anaerobisiert und anschließend autoklaviert. Thermolabile Substanzen (Tab. 3) wurden sterilfiltriert (0,2 µm, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) und zu bereits autoklavierten Medien hinzugegeben.

Tab. 2: **Zusammensetzung der LB-Medien.**

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

Tab. 3: **Komplementationslösungen, welche im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.**

<i>Komponente</i>	<i>Finale Konzentration</i>
DAP	0,3 mM
Kanamycin	50 $\mu\text{g ml}^{-1}$
Arabinose	100 μM
Saccharose	10 % (w/v)

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

<i>Substanz</i>	<i>mg l⁻¹</i>	<i>mM</i>
Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	2501,5	6,72
Mn(II)SO ₄ x H ₂ O	22,0	0,13
NaCl	58,4	1,00
Fe(II)Cl ₂ x 4 H ₂ O	107,4	0,54
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	119,0	0,50
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	30,0	0,10
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	5,0	0,02
H ₃ BO ₃	350,0	5,66
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	94,4	0,39
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	119,0	0,50
Na ₂ SeO ₄ x 10 H ₂ O	55,4	0,15

Tab. 5: **Zusammensetzung des M4-Mediums.**

<i>Substanz</i>	<i>g l⁻¹</i>	<i>ml l⁻¹</i>	<i>mM</i>
K ₂ HPO ₄	0,22		1,26
KH ₂ PO ₄	0,09		0,66
HEPES	1,14		4,78
NaHCO ₃	0,17		2,02
NH ₄ SO ₄	1,19		9,01
NaCl	8,77		150,07
Caseinhydrolysat	1,00		
Spurenelemente (siehe Tab. 4)		10	
MgSO ₄			1,00
CaCl ₂			0,10

Tab. 6: Medien zur Kultivierung von *S. oneidensis* basierend auf M4-Medium (siehe Tab. 5).

	70 mM <i>Laktat</i>	100 mM <i>Fumarat</i>	Anoxisch (N_2)
Waschpuffer	-	-	-
Oxische Kultivierung	✓	-	-
Anoxische Kultivierung	✓	✓	✓
MEZ-Medium	✓	-	✓

Tab. 7: 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> -Aminobenzoesäure	5,0
Liponsäure	5,0

Tab. 8: Zusammensetzung der NB-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. 9: Zusammensetzung der Selenit-Wolframat-Lösung (1000X).

<i>Substanz</i>	<i>mg l⁻¹</i>	<i>μM</i>
NaOH	500	12.501
Na ₂ SeO ₃	3	17
Na ₂ WO ₄ x 2 H ₂ O	4	12

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

<i>Substanz</i>	<i>g l⁻¹</i>	<i>ml 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
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		
Vitaminlösung (siehe Tab. 7)		1	
NB-Spurenelemente (siehe Tab. 8)		10	
Selenit-Wolframat (siehe Tab. 9)		1	

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

Tab. 11: Medien basierend auf dem Grundmedium zur Kultivierung von *G. sulfurreducens* (siehe Tab. 10).

<i>Verwendung</i>	<i>Mikroorganismus</i>	<i>Laktat</i> [mM]	<i>Acetat</i> [mM]	<i>Fumarat</i> [mM]	<i>Hefeextrakt</i> [g l ⁻¹]
Waschpuffer	<i>S. oneidensis</i>	-	-	-	-
	<i>G. sulfurreducens</i>	-	-	-	-
	Cokultur	-	-	-	-
Vorkultur	<i>S. oneidensis</i>	70	-	100	-
	<i>G. sulfurreducens</i>	-	15	40	1
MEZ	<i>S. oneidensis</i>	20	-	-	-
	<i>G. sulfurreducens</i>	-	20	-	-
	Cokultur	20	-	-	-

Die Kultivierung von Zellen erfolgte ausgehend von Gefrierkulturen (Abschnitt 2.1.4), welche zur Verwendung auf LB-Agar-Platten (Tabelle 2) ausgestrichen und bei 30 °C (*S. oneidensis*) bzw. 37 °C (*E. coli*) inkubiert wurden. Kulturen in Flüssigmedien wurden mit Einzelkolonien von diesen Platten inokuliert und bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. Zur Anzucht von *G. sulfurreducens*-Kulturen wurden 2 ml einer Cryo-Kultur (Abschnitt 2.1.4) in 1 l anaerobisiertes Vorkulturmedium (siehe Tab. 11) überführt. Diese Kultur wurde für mindestens 5 Tage bei 30 °C inkubiert und anschließend maximal 5 mal überführt.

2.1.4 Cryokonservierung

Die dauerhafte Aufbewahrung von Bakterienstämmen erfolgte durch Cryokonservierung. Hierzu wurde 1 ml einer dicht bewachsenen Flüssigkultur in einem Cryoröhrchen mit 300 µl Glycerin versetzt und unmittelbar in flüssigem N₂ tiefgefroren. Die anschließende Lagerung erfolgte bei -80 °C sowie in flüssigem Stickstoff.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolation von Plasmid-DNA und Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Isolation von Plasmid-DNA erfolgte aus 2 ml einer aeroben LB-Kultur mit Hilfe des Wizard Plus Miniprep DNA Purification Systems (Promega, Mannheim) nach Vorgaben des Standardprotokolls. Die Lagerung präparierter Plasmide erfolgte bei -20 °C.

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die Reaktionen wurden mit dem C1000 oder S1000 Thermocycler (Bio-Rad, Kalifornien, USA) durchgeführt. Zur präparativen Amplifikation von DNA wurde die PCR_{BIO} HiFi Polymerase (PCR Biosystems, London, GB) in Ansätzen von 15 - 50 μ l verwendet. Zur Kontrolle von Klonierungsschritten wurden analytische PCRs durchgeführt. Hierzu wurde MangoMix[®] (Bioline, Luckenwalde) in Ansätzen von 15 μ l verwendet. Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze ist in Tabelle 12, verwendete Primer in Tabelle 13 und PCR-Protokolle in Tabelle 14 angegeben. Um Einzelklone mittels PCR-Reaktionen zu untersuchen oder um genomische Abschnitte direkt zu amplifizieren, wurden Bakterienkolonien als Grundlage für die PCR-Reaktion eingesetzt. Damit entfiel die vorangehende DNA-Isolation (Güssow und Clackson, 1989). Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte nach Erfolgskontrolle durch Gelelektrophorese (Abschnitt 2.2.3), mit Hilfe des Wizard SV Gel and PCR Clean-up Kits (Promega, Mannheim).

Tab. 12: **Zusammensetzung der PCR-Ansätze für jeweils 15 μ l.**

	<i>MangoMix</i> [®]	<i>PCR_{BIO} Hifi</i>
Mastermix	7,5 μ l	-
Puffer	-	3 μ l
Primer _{fwd} [10 μ M]	0,75 μ l	0,6 μ l
Primer _{rev} [10 μ M]	0,75 μ l	0,6 μ l
Polymerase	-	0,15 μ l
Template	50 ng	50 ng
ddH ₂ O	auffüllen auf 15 μ l	

Tab. 13: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (Primer).

Nr.	Sequenz 5'-3'	Verwendung
41	CTGGCGAAAGGGGGATGTG	Testprimer: pMQ-Plasmid
42	CATTAGGCACCCCAGGCTTTAC	
52	GGACCACCGCGCTACTGC	Testprimer: pBAD-Plasmid
1194	GATTAGCGGATCCTACCTGAC	
3472	AACTTTAAGAAGGAGATATACATAC	Gibson-Ligation: <i>aggA</i>
	CCATGATGAAGACTTTAGTAAGACG	
3473	CCGCCAAAACAGCCAAGCTGGAGAC CGTTTTTCATTGATTTGCTCCTC	
3474	AGTGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGG TCGAGTGTCATTGAAGCCCG	Gibson-Ligation: <i>bpfG</i>
3475	TCTGTCTAACAGTGTCATCTTGGG TGAGCCTACTCTATTGGTGT	
3476	ACACCAATTAACACCAATAGAGTA GGCTCACCCAAGATGACACT	
3477	TACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGG GATCGATGGCGACCAAAAAC	
3490	AGTGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGG TCGAACACCATGGGCTTATG	
3491	TAATTACCGATCCCATTAAGAAAC ATATTTATAACAAATTATTC	Gibson-Ligation: P _{<i>bpfA</i>}
3492	ATAATTTGTTATAAATATGTTTCTT TAATGGGATCGGTAATTACA	
3493	AGCTCGGTACCCGGGGATCGTATTG CTGTCTTGGCTAGTATAGAAGGTG	
3494	AATGATTAAGTACCACCTTAATAAA GAAACATATTTATAACAAATTATTC	Gibson-Ligation: P _{<i>cymA</i>}
3495	TTTGTTATAAATATGTTTCTTTATT AAGGTGGTACTTAATCATTT	
3496	TTTGACAATATTTTTGGAGATAGAG TAATGGGATCGGTAATTACA	

2 Material und Methoden

Fortsetzung: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.

Nr.	Sequenz 5'-3'	Verwendung
3497	TTGATGTAATTACCGATCCCATTAC TCTATCTCCAAAAATATTGT	
3498	TCGCTATCATTGTTGAGC	Testprimer: ΔP_{bpfA}
3499	TACAAACAGCGAGTCTC	
3500	TCAATATTGACGAGATGACC	Testprimer: $\Delta bpfG$
3501	CATGTTTCAGATAGGGCA	
3502	TGAATCTCCACCATTGAC	Einführung Punktmutation: <i>bpfG</i> (C116S)
3503	TCAGAAGATTTTTCAATCGC	
3504	TCGATGACATAAAATTATGGG	Testprimer: <i>bpfG</i> (C116S)
3505	GTGATCCGCATCTTATCT	
3523	CTTTAAGAAGGAGATATACATACCA TGACACGTTACGAACAAATTAA	Gibson-Ligation: <i>wbpP</i>
3524	AGCCAAGCTGGAGACCGTTTTTATG CCAAAACTCCTTGTAC	
3525	CTTTAAGAAGGAGATATACATACCA TGATGTTTGATGTAGTAAATGC	Gibson-Ligation: <i>wbpA</i>
3526	GTTCGTAACGTGTCATGTGAAATCC AATCAGAAGCAAG	
3527	ATGACACGTTACGAACAAATTAA	Testprimer: <i>wbpP</i>
3560	TAAGAAGGAGATATACATACCCATG ATGACACGTTACGAACAA	Gibson-Ligation: <i>wbpA</i>
3561	AAAACAGCCAAGCTGGAGACCGTTT TTATGCCAAAACTCCTTG	

Tab. 14: Übersicht über verwendete PCR-Protokolle.

<i>Schritt</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>		<i>Zyklen</i>
		<i>PCRBIO</i> <i>Hifi</i>	<i>MangoMix</i> [®]	
Initiale Denaturierung	95 °C	300 s	300 s	1
Denaturierung	95 °C	15 s	30 s	
Hybridisierung	55 - 65 °C	15 s	30 s	28 - 32
Elongation	72 °C	30 s/kb	30 s/kb	
Endpolymerisation	72 °C	30 s	30 s	1

2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese und Aufreinigung

Eine Trennung von Nukleinsäuren nach ihrer Größe erfolgte elektrophoretisch mit Hilfe von Agarose-Gelen. Hierzu wurde 1 % Agarose (w/v) bis zum vollständigen Auflösen in TAE-Puffer (Tab. 15) aufgekocht und anschließend mit 2 ppm Midori Green Advance DNA Stain (NIPPON Genetics, Düren) versetzt. Midori Green interkaliert in DNA-Doppelstränge und weist bei Anregung mit UV- oder Blau/Grünlicht eine starke Fluoreszenz auf. Nach abgeschlossener Polymerisation wurde das Gel in eine Laufkammer eingesetzt und die Proben in einem elektrischen Feld mit TAE-Puffer (Tab. 15) als Elektrolyt zwischen 120 V (Powerpack Universal, Bio-Rad, Kalifornien, USA) getrennt. Da MangoMix[®] bereits Ladepuffer enthält, konnten diese Reaktionsansätze direkt verwendet werden und PCRBIO Hifi Amplifikate wurden mit Ladepuffer (Tab. 16) versetzt. 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) wurde als Größenstandard eingesetzt. Die Aufreinigung einzelner DNA-Fragmente erfolgte aus Gel-Ausschnitten mit Hilfe des Wizard SV Gel and PCR Clean-up Kits (Promega, Mannheim).

Tab. 15: **Zusammensetzung des TAE-Puffers (50X).**

<i>Substanz</i>	<i>g L⁻¹</i>	<i>mM</i>
Tris-HCl (pH 8)	6,30	40
Eisessig	1,20	20
Na ₂ EDTA	0,93	1

Tab. 16: **Zusammensetzung des Ladepuffers (6X).**

<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>
Bromphenolblau	10 mg
Xylencyanol FF	0,05 g
Glycerin	12 ml
TAE-Puffer (50X, Tab. 15)	1,5 ml
ddH ₂ O	15 ml

2.2.4 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde die jeweilige Probe in einem Volumen von 1 µl spektrophotometrisch mittels NanoDrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) quantifiziert. Diese Methode wurde standardmäßig für alle isolierten Nukleinsäuren durchgeführt.

2.2.5 Sanger-Sequenzierung und bioinformatische Auswertung

Die Sequenzen von PCR-Amplifikaten und Plasmiden wurde nach Aufreinigung mit der Sanger-Methode (Sanger *et al.*, 1977) unter Verwendung des Mix2Seq Kits (Eurofins Genomics, Ebersberg) sequenziert. Eine Überprüfung erfolgte *in-silico* mithilfe der CLC Main Workbench in der Version 8.0 (Qiagen, Aarhus, DNK).

2.2.6 Restriktion und Ligation

Zur Klonierung von pBAD- und pMQ-Plasmiden wurden diese zunächst unter Verwendung von NcoI und PmeI bzw. BamHI und Sall linearisiert. Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von New England Biolabs (Schwalbach) bezogen und nach zugehörigem Protokoll verwendet. Die Zusammensetzung eines Restriktionsansatzes kann Tabelle 17 entnommen werden.

Tab. 17: **Ansatz eines Restriktionsansatzes.**

<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>
Puffer (10X)	2 µl
Restriktionsenzym	je 1 µl
DNA	2-3 µg
ddH ₂ O	ad 20 µl
37 °C für 30 min	

Die enthaltenen Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt (Abschnitt 2.2.3) und jeweils das 4 kb (pBAD) bzw. das 8,1 kb (pMQ) große Fragment aufgereinigt. Entsprechende Zielgene wurden amplifiziert und ebenfalls aufgereinigt. Zur Ligation wurde das Verfahren der isothermalen *in-vitro*-Ligation nach Gibson verwendet (Gibson *et al.*, 2009). Hierzu wurden äquimolare Mengen der zu ligierenden Fragmente in einer Gesamt-DNA-Konzentration von 10-100 ng und einem Volumen von 5 µl in einen Reaktionsansatz von 15 µl gegeben (Tab. 18 - 19). Der Ligationsansatz wurde nach einer Reaktionszeit von 90 min bei 50 °C für 20 min dialysiert (MF-Millipore Membran 0,025 µm hydrophil, Merck, Darmstadt). Die generierten Plasmide wurden mittels Elektroporation in Zellen eingebracht.

Tab. 18: **Zusammensetzung der Stammlösung (5X) für Ligationsansätze.**

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

Tab. 19: **Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur isothermalen *in-vitro*-Ligation nach Gibson.**

<i>Komponente</i>	<i>Menge [μl]</i>
Stammlösung (5X, Tab. 18)	125
PCRBIO Hifi Polymerase (2 U μl^{-1})	5
Taq DNA-Ligase (40 U μl^{-1})	40
T5 Endonuklease (0,1 U μl^{-1})	16
ddH ₂ O	239

2.2.7 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation

Elektroporation ist eine Methode, bei der kurzzeitig eine elektrische Spannung angelegt wird, um reversible Poren in der Zellmembran von Zellen zu erzeugen. Zur Herstellung elektrokompenter Zellen wurde eine Vorkultur des Zielstammes in LB-Medium (Tab. 2) kultiviert. Während der exponentiellen Wachstumsphase, zwischen einer OD₆₀₀ von 0,6 und 0,8, wurden die Zellen in einer Tischzentrifuge für 30 s bei 16.372 g pelletiert und viermal mit sterilem ddH₂O (*E. coli*) bzw. steriler 3 M Sorbitollösung (*S. oneidensis*) gewaschen (Dower *et al.*, 1988; Cao *et al.*, 2019). Im Anschluss wurden die Zellen in 200 μl Wasser bzw. Sorbitollösung aufgenommen. Je 100 μl Zellsuspension wurden zusammen mit bis zu 2 μg Plasmid oder 10 μl eines isothermalen *in-vitro*-Ligationsansatzes in eine Elektroporationsküvette (Elektroden-

abstand 1 mm, Bio-Rad, Kalifornien, USA) gegeben. Die Elektroporation erfolgte mit einem Mikropulser (Bio-Rad, Kalifornien, USA) durch Anlegen einer Spannung von 1,8 kV (*E. coli*) bzw. 1,2 kV (*S. oneidensis*). Die Regeneration der Zellen erfolgte sofort nach dem elektrischen Puls durch Aufnahme in 1 ml LB-Medium (Tab. 2). Die transformierten Zellen wurden im Anschluss für 60 min bei 37 °C (*E. coli*) bzw. 120 min bei 30 °C (*S. oneidensis*) inkubiert.

2.2.8 Konjugation und markerlose Modifikation von Genen in *Shewanella oneidensis*

Um in *S. oneidensis* markerlose genomische Veränderungen vorzunehmen, wurde der Suizidvektor pMQ150 verwendet. Nach Linearisierung (Abschnitt 2.2.6) wurden in die Schnittstelle 500 bp lange Bereiche eingeführt, welche den zu modifizierenden Bereich flankieren. Sollte ein Bereich deletiert werden, wurden die flankierenden Bereiche direkt aneinander ligiert. Um eine neue Nukleotidsequenz einzuführen, wurde diese zwischen den beiden 500 bp langen Regionen eingefügt. Das klonierte Plasmid (siehe Abschnitt 2.2.1) wurde in *E. coli* WM3064 transformiert (siehe Abschnitt 2.2.7). Dieser Stamm weist eine 2,6-Diaminopimelinsäureauxotrophie auf und ist daher zum Wachstum auf die Zugabe von DAP angewiesen. Außerdem trägt dieser Stamm das *pir*-Gen, welches für das π -Protein kodiert. Dieses Protein wird benötigt, um das pMQ150-Plasmid stabil zu replizieren, da es den R6K-Replikationsursprung trägt. Des Weiteren enthält das Plasmid zur Gegenselektion das *sacB*-Gen. Dieses codiert für eine Levansucrase und katalysiert die Umwandlung von Saccharose in Zuckerpolymere.

Die Transformation von pMQ150-Plasmiden in *S. oneidensis* erfolgte mittels Konjugation. Der Plasmid-tragende *E. coli* WM3064-Stamm wurde zusammen mit

dem Empfängerstamm auf einer Agarplatte ohne Antibiotikum mit 0,3 mM DAP ausgestrichen. Nach Inkubation über Nacht bei 30 °C wurde Zellmaterial von dieser Platte auf eine mit Kanamycin versetzte Platte ohne DAP übertragen und erneut bei 30 °C inkubiert, bis Einzelkolonien erkennbar waren. Infolge der DAP-Auxotrophie von *E. coli* WM3064 kann der Stamm auf dieser Platte nicht wachsen und aufgrund der Kanamycin-Zugabe wachsen nur *S. oneidensis*-Zellen, welche das Plasmid durch Konjugation empfangen haben. In Ermangelung des π -Proteins kann jedoch der *Shewanella*-Stamm das Plasmid nicht stabil replizieren, sodass nur Zellen wachsen, die das Plasmid in das Genom rekombiniert haben. Einzelkolonien wurden gepickt und auf eine neue Kanamycin-LB-Platte übertragen und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden 5 mL Flüssig-LB ohne NaCl mit einer Einzelkolonie dieser Platte inokuliert und über Nacht schüttelnd bei 300 rpm und 30 °C inkubiert. Zur Gegenselektion wurden von dieser Kultur mehrere Verdünnungen (1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000) auf LB-Platten ohne Salz mit Saccharose ausplattiert und bei 30 °C inkubiert, bis Einzelkolonien sichtbar wurden. Die Expression von *sacB* führt zum Tod von transformierten Zellen, wenn sie in Gegenwart von Saccharose ausplattiert werden. Der Mechanismus der Toxizität konnte bisher nicht vollständig geklärt werden, wobei die gängige Theorie ist, dass die Akkumulation von Levanen im Periplasma von gramnegativen Bakterien toxisch ist (Steinmetz *et al.*, 1983). Somit können nur *Shewanella*-Zellen in Gegenwart von Saccharose überleben, bei denen im Rahmen eines zweiten Rekombinationsereignisses das Plasmid über die beiden 500-bp-Nukleotidsequenzen in das Genom integriert wurde. Durch diese Rekombination entsteht zu 50 % der Ausgangsstamm und zu 50 % der gewünschte Stamm mit der entsprechend modifizierten Nukleotidsequenz.

2.3 Kultivierung und Analyse von Biofilmen

Biofilme wurden mit einer Plattform kultiviert, basierend auf Hansen *et al.* (2019). Die bereits bestehende Infrastruktur wurde um verschiedene Neuerungen erweitert, welche im Folgenden beschrieben sind.

2.3.1 Mikrofluidische Plattform

2.3.1.1 Fertigung von mikrofluidischen Reaktoren

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Reaktoren wiesen einen geraden Kultivierungskanal mit einer Länge von 61,75 mm und einem Gesamtvolumen von 354 μl auf (siehe Abb. 6). Die Grundfläche eines Reaktors betrug 76 x 26 mm, was der Standard-Objektträgergröße entspricht. Zur Fertigung der Reaktoren wurde das Sylgard[®] 184 Silicone Elastomer Kit (Michigan, USA) nach zugehörigem Protokoll verwendet. Das PDMS wurde in eine Negativform aus Messing (siehe Abb. 7) gefüllt und polymerisierte anschließend für 2 h bei 60 °C aus. Der Kultivierungskanal konnte hierbei über verschiedene Anschlüsse durch Einsetzen von Platzhalterkanülen zugänglich gemacht werden. Bei Bedarf konnte zur Schaffung einer 1 x 1 cm großen Aussparung im Silikonkörper ein optionales Messingteil in die Gießform eingesetzt werden. In diese Aussparung kann ein 1 x 1 cm großes Objekt eingesetzt werden.

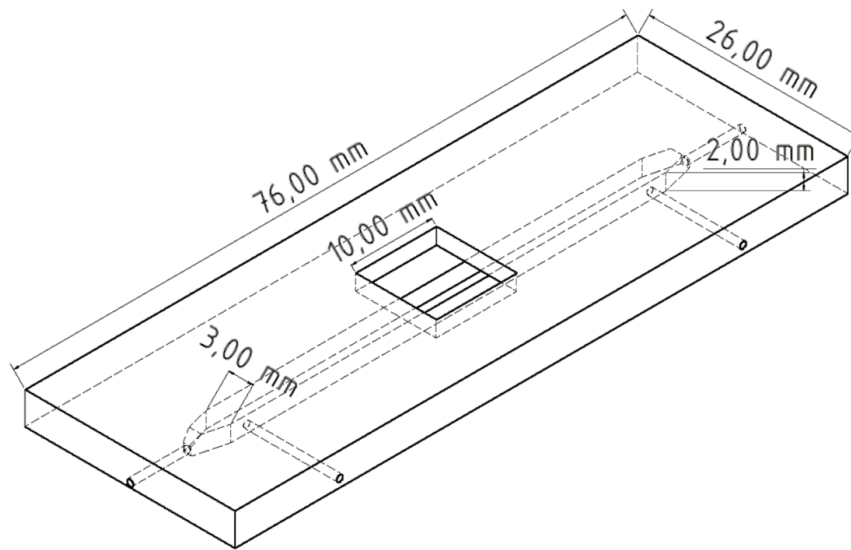


Abb. 6: **Technische Zeichnung eines mikrofluidischen Reaktors.** Es ist eine dreidimensionale Ansicht eines Reaktors dargestellt, in dem vorne und hinten Kanülen zur Mediumszu- und -abfuhr und seitlich eine Inokulationskanüle sowie eine Referenzelektrode platziert werden können. In die obere Aussparung kann ein 1 x 1 cm Objekt, wie z. B. eine Elektrode, zur Oberflächenuntersuchung eingesetzt werden. Anzahl und Lokalisation der Kanülenzugänge sowie die obere Aussparung sind optional und können entsprechend des durchzuführenden Experiments angepasst werden. Der Kultivierungskanal hat ein Gesamtvolumen von 354 μ l und ist insgesamt 61,75 mm lang (bzw. 54 mm wird nur der Quader betrachtet).

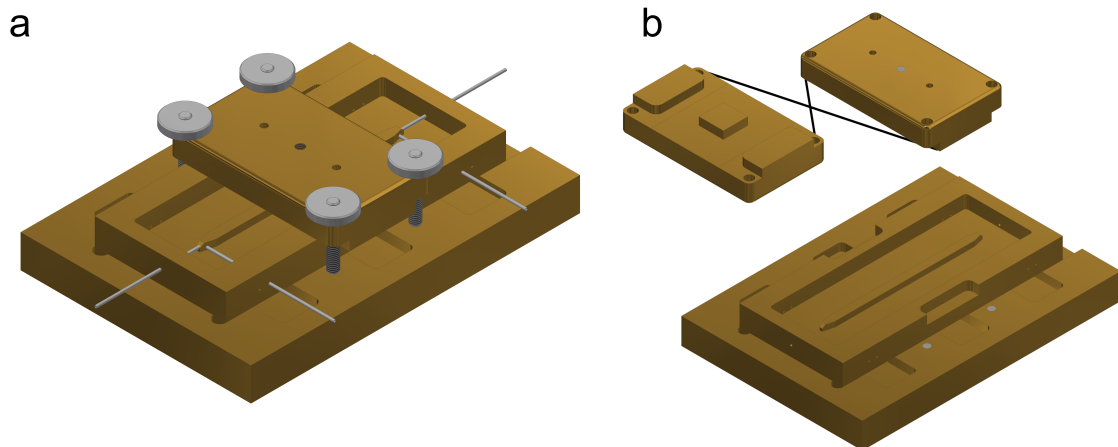


Abb. 7: **Messingform zur Fertigung von mikrofluidischen PDMS-Reaktoren.** In a ist eine zusammengesetzte Gießkammer mit vier eingesetzten Platzhalterkanülen dargestellt. Mit vier Rändelmutter kann bei Bedarf ein Messingteil zur Schaffung einer 1 x 1 cm großen Aussparung im Silikonkörper angebracht werden. In b sind die Einzelteile der zusammengesetzten Gießkammer (jedoch ohne Kanülen) dargestellt.

Der offene Kanal des ausgehärteten Silikonkörpers wurde durch einen Objektträger (1 mm Stärke) verschlossen, welcher durch Sauerstoffplasmabehandlung (Plasma Flecto 10, Plasma Technology, Herrenberg) kovalent an das Silikon gebunden wurde. Zur Stärkung der Bindung zwischen Silikon und Glas, wurde der Reaktor anschließend für weitere 10 - 20 Minuten bei 100 °C inkubiert. Zwei verschiedene mikrofluidische Reaktoren sind beispielhaft in Abbildung 8 dargestellt.

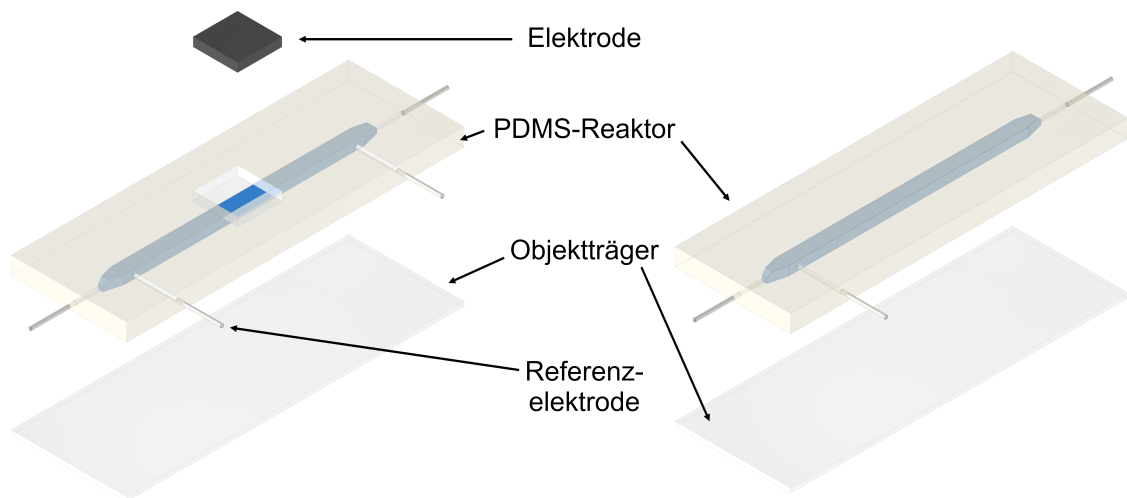


Abb. 8: **Zwei verschiedene beispielhafte mikrofluidische Reaktoren.** Durch Einsetzen von Platzhalterkanülen in die Messingform bei der Fertigung der Reaktoren können Zugänge an beliebigen Positionen geschaffen werden. In diese können später Kanülen zur Mediumszu- und -abfuhr oder eine Referenzelektrode eingesetzt werden. Außerdem kann bei Bedarf eine 1 x 1 cm großen Aussparung im Silikonkörper geschaffen werden, in welche eine Elektrode eingesetzt werden kann.

2.3.1.2 Plattform für eine multiparallele mikrofluidische Biofilmkultivierung

Alle Komponenten der mikrofluidischen Kultivierungsplattform wurden so entworfen, dass sie modular einsetzbar sind. Ziel war es, Experimente multiparallel mit maßgeschneiderten Versuchsbedingungen unter Anwendung möglichst nicht-destruktiver *in-situ*-Analysemethoden durchführen zu können. Im Rahmen dieser Arbeit sind drei verschiedene Arten der Biofilmkultivierung zu unterscheiden: Nutzung von (I) Sauerstoff, (II) Fumarat oder (III) einer Anode als terminaler Elektronenakzeptor. Alle

Versuche wurden in Kammern durchgeführt, welche jeweils ein Triplikat beherbergen. Diese Kammern bestehen aus jeweils zwei Teilkammern, wobei nicht beide gleichzeitig genutzt werden müssen. In jeder Teilkammer ist Platz für drei Reaktoren, sodass Unikate aus ein oder zwei Reaktoren bestehen können. Stumpfe Kanülen wurden an den Positionen der jeweilig zuvor entfernten Platzhalterkanülen eingesetzt, wobei die Kanülen zur Mediumszu- und abfuhr einen Innendurchmesser von 0,95 mm und die Kanülen zur Inokulation einen Innendurchmesser von 0,57 mm aufwiesen. Verbindungen zu den Reaktoren wurden über Luer-Verbinder hergestellt und Zugänge zu den Versuchskammern über stumpfe Kanülen mit einem Innendurchmesser von

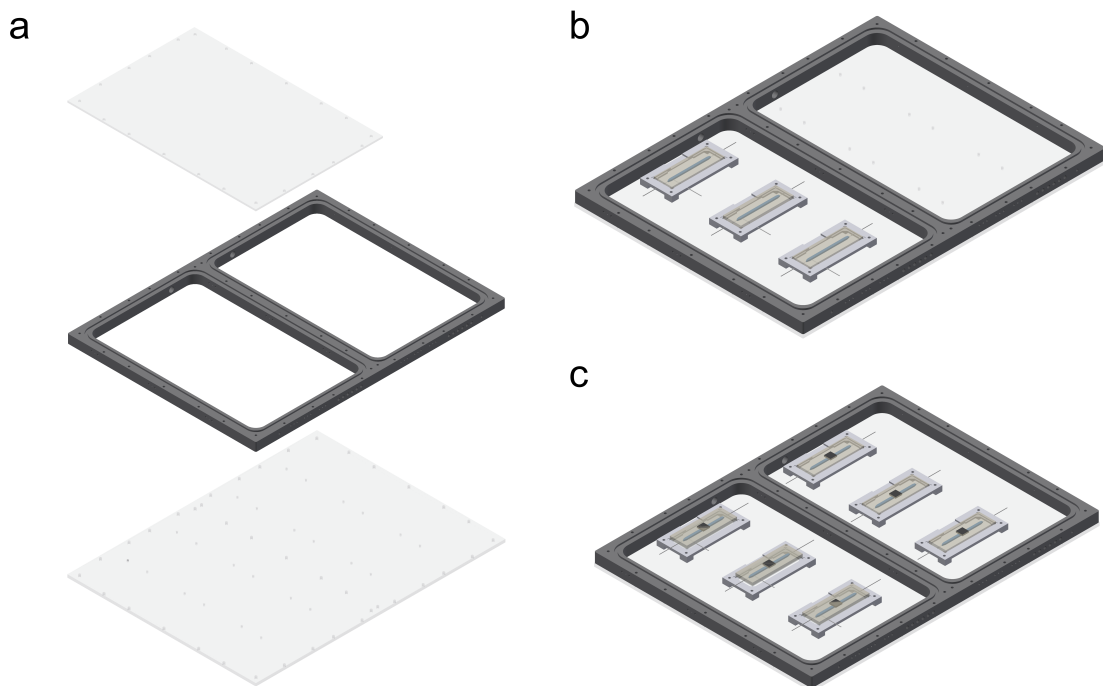


Abb. 9: **Versuchskammern zur Kultivierung von mikrofluidischen Fließzellen.** **a** Eine Kammer besteht grundsätzlich aus einer Bodenplatte und einem Rahmen. Bei Bedarf kann auf jede Teilkammer ein Deckel platziert werden. In **b** ist eine Kammer dargestellt, in der ein Versuchsunikat aus nur einem Reaktor besteht. Dieser Versuchsaufbau wurde zur Kultivierung von oxischen Biofilmen (ohne Deckel) und anoxischen Biofilmen (mit Deckel) verwendet. In **c** ist eine Kammer für bioelektrochemische Versuche gezeigt. In einer Teilkammer mit Deckel sind die anodischen Reaktoren (Arbeitselektrode) platziert und in der Teilkammer ohne Deckel die kathodischen Reaktoren (Gegenelektrode). Die mikrofluidischen Reaktoren können auf Halterungen platziert werden, welche in **b** und **c** zu sehen sind (siehe auch Abb. A7).

0,95 mm. Für anoxische Kultivierungen kann auf jeder Teilkammer ein Deckel platziert und die Kammer durch seitliche Zugänge kontinuierlich begast werden. Sowohl Deckel als auch Bodenplatte und Rahmen sind aus vergleichsweise gasundurchlässigem Polycarbonat gefertigt. In Abb. 9 sind Versuchskammern der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente dargestellt.

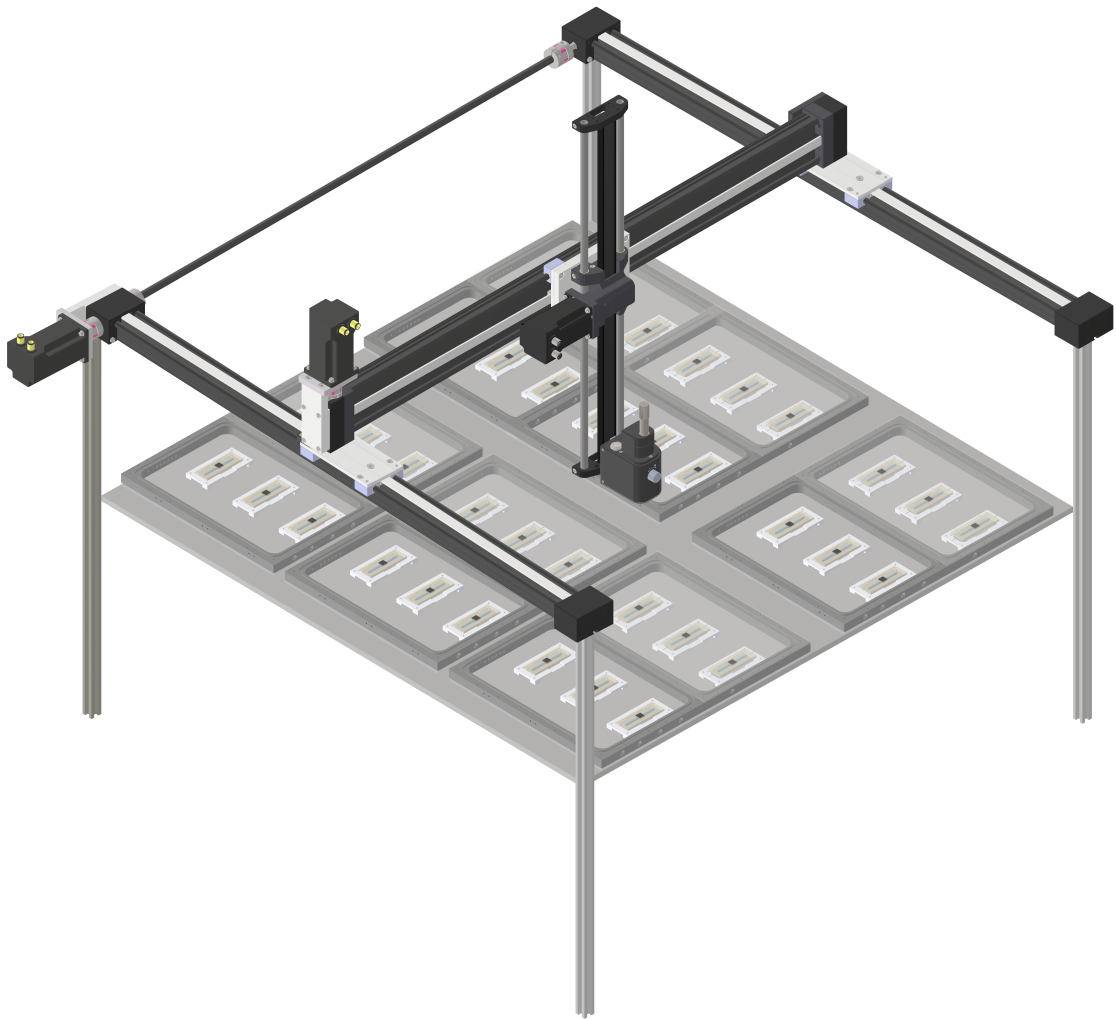


Abb. 10: **Robotische Plattform für eine multiparallele mikrofluidische Biofilmkultivierung.** Das Raumportal hat einen dreidimensionalen Arbeitsraum von 80 x 80 x 50 cm (x/y/z) und bietet Platz für bis zu sechs Polycarbonat-Gehäuse. Die Biofilmentwicklung kann durch Integration eines optischen Kohärenztomographen (OCT) automatisiert überwacht werden.

Um die aktive Arbeitszeit bei Nutzung der Plattform weitestgehend zu reduzieren, wurde die Bildroutine mittels optischer Kohärenztomographie (OCT) in ein Raumportal (DLE-RG-0003, igus[®], Köln) integriert. Das Raumportal hat einen dreidimensionalen Arbeitsraum von 80 x 80 x 50 cm (x/y/z) und bietet Platz für bis zu sechs Polycarbonat-Gehäuse (siehe Abb. 10). An der z-Achse wurde eine Halterung montiert, an die der OCT-Scanner über eine Schwalbenschwanzhalterung befestigt werden kann.

2.3.1.3 Herstellung von Ag/AgCl-Referenzelektroden

Aufgrund der Dimensionen der Zugangsstellen zu den mikrofluidischen Reaktoren mussten geeignete Referenzelektroden elektrochemisch hergestellt werden. Zu diesem Zweck wurde ein 3 cm langes Stück Silberdraht mit einem Durchmesser von 0,8 mm (ChemPur, Karlsruhe) zunächst in Reinstethanol gereinigt. Der trockene Silberdraht, umgeben von einem feinen Platinnetz, wurde anschließend in ein Becherglas mit 0,1 M entgaster Salzsäure getaucht. Die Oberfläche des Becherglases wurde mit Stickstoff gespült. Anschließend wurde an den Silberdraht, welcher die Arbeitselektrode darstellte, ein Potential angelegt, wobei das Platinnetz die Gegenelektrode darstellte. Als Referenzelektrode wurde eine handelsübliche Ag/AgCl-Referenzelektrode verwendet. Zur Equilibrierung wurde zunächst 5 Minuten lang eine Leerlaufspannung (OCV, *open circuit voltage*) und anschließend 50 Minuten lang eine Spannung von 50 mV gegen OCV angelegt. Die so hergestellte Ag/AgCl-Elektrode wurde nach der Präparation getrocknet. Für jeden anodischen Reaktor wurde eine frisch hergestellte Referenzelektrode verwendet.

2.3.2 Optische Analysen

Biofilme können optisch mit Hilfe mehrerer Methoden untersucht werden, wobei das eigentliche bildgebende Verfahren anhand der abgebildeten Größenordnung klassifiziert werden kann. Wagner *et al.* (2010) haben ein skalenübergreifendes Schema eingeführt, in der zwischen der Untersuchung einzelner Zellen, mikroskopischer, mesoskopischer sowie makroskopischer Strukturen unterschieden wird (Abb. 11). Lichtmikroskopie fügt sich hier im Bereich zwischen der Darstellung einzelner Zellen und mikroskopischen Strukturen bis hin zur teilweisen Darstellung mesoskopischer Strukturen ein. Insbesondere wird Lichtmikroskopie eingesetzt, um gefärbte oder mit Sonden markierte Biofilme zu untersuchen. Biofilme können jedoch zum Teil mehrere hundert Mikrometer groß werden, was eine lichtmikroskopische Untersuchung unhandlich oder sogar unmöglich macht. Optische Kohärenztomographie (OCT) stellt hier eine Möglichkeit dar, um Biofilme mesoskopisch abbilden zu können. Werden

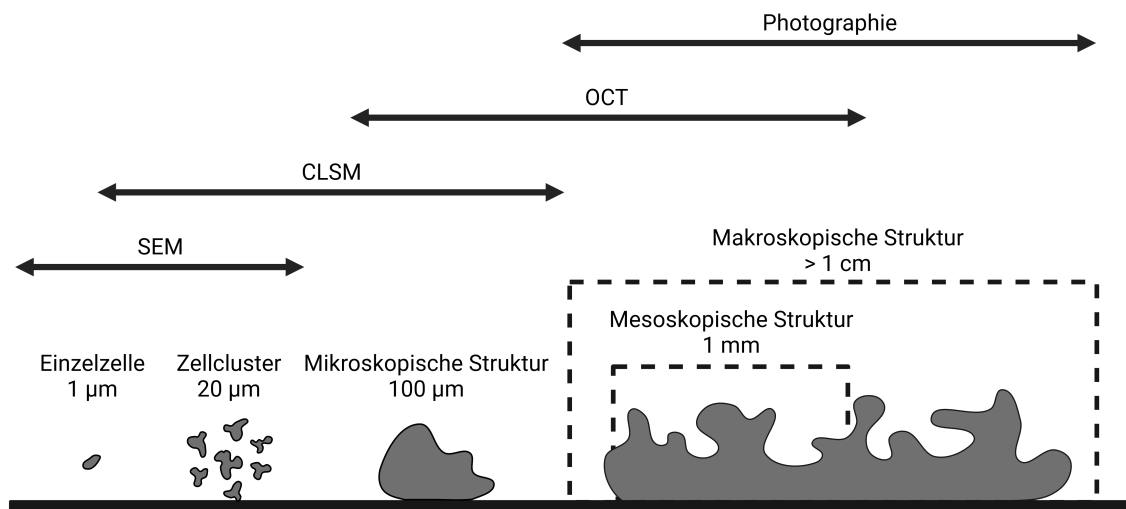


Abb. 11: **Techniken zur optischen Untersuchung von Biofilmstrukturen in verschiedenen Maßstäben nach Wagner *et al.* (2010).** SEM = Rasterelektronenmikroskopie (*scanning electron microscopy*), CLSM = konfokales Laser-Scanning-Mikroskopie (*confocal laser scanning microscopy*) und OCT = optische Kohärenztomographie (*optical coherence tomography*).

Biofilme mittels OCT untersucht, steht weniger die Verteilung einzelner Zellen oder Zelltypen, sondern mehr die allgemeine Architektur und die Entwicklung des Biofilms über die Zeit im Fokus.

2.3.2.1 Biofilmbestimmung mittels optischer Kohärenztomographie

OCT ist ein interferometrisches Bildgebungsverfahren, welches nicht-invasiv arbeitet und in Echtzeit 1D-Tiefen-, 2D-Querschnitts- oder 3D-Volumenbilder aufnehmen kann. OCT-Bilder wurden in dieser Arbeit mit einem GanymedeTM-Spektral-domänensystem (GAN611C1-SP1, Thorlabs, Dachau) aufgenommen. Der Tomograph beinhaltet eine Lichtquelle, einen dichroitischen Spiegel (Strahlenteiler), einen Referenzarm mit einer konstanten Länge und einen Probenarm. Der Probenarm ist mit einer Objektivlinse ausgestattet, welche auf die Probe, in diesem Fall den Biofilm, fokussiert wird. Die zentrale Wellenlänge der Lichtquelle beträgt 930 nm mit einer Bandbreite von 100 nm. Das Licht wird von der Probe reflektiert und gestreut und interferiert mit dem Licht des Referenzarms am Strahlenteiler. Diese Interferenzsignale werden digital aufgenommen und analysiert. OCT-Bilder liefern somit strukturelle Informationen über eine Probe auf der Grundlage des von verschiedenen Materialschichten innerhalb der Probe zurückgestreuten Lichts.

Die Auswahl der Aufnahmeparameter sowie Datenauswertung erfolgten wie beschrieben nach Wagner und Horn (2017). OCT-Bilder wurden mit Pixeldimensionen von $4 \times 4 \times 2,14 \mu\text{m}$ (x/y/z) bei einer Aufnahmegeschwindigkeit von 100 kHz aufgenommen. Zur Beschreibung und Quantifizierung der Biofilme wurden die aufgenommenen Datensätze in mehreren aufeinander folgenden Schritten mit (Fiji Is Just) ImageJ Version 2.1.0/1.53 (Schindelin *et al.*, 2012) bearbeitet. Der wichtigste Schritt der

Datenprozessierung ist die Trennung der Biomassedaten vom Hintergrundrauschen. Rohbilder haben eine Bit-Tiefe von 32 (2^{32}), was bedeutet, dass jeder Pixel einen Wert zwischen 0 und $2^{32}-1$ hat. Aufgrund der Auflösung der verwendeten Monitore wurden die Bilder zunächst in 2^8 -Bilder konvertiert. Zur Trennung von Biomasse- und Hintergrundsignal muss ein passender Schwellenwert (0-255) angelegt werden, wodurch die Bilder binarisiert werden. Nach der Binarisierung haben die Bilder eine Bit-Tiefe von 2 (2^1), wobei Biofilmpixel weiß und Hintergrundpixel schwarz sind. Alle weiteren Arbeitsschritte und Berechnungen basierten auf diesen Binärdaten. Das Biofilmvolumen wurde berechnet, indem die Anzahl der weißen Pixelsignale mit der Voxelgröße der Bilder korreliert wurde. Auf Grundlage der von Wagner und Horn (2017) entwickelten Prozessroutine wurden Höhenkarten der Biofilme erstellt und die Oberflächenbedeckung auf Grundlage dieser Höhenkarten bestimmt. Die Porosität Φ der Biofilme wurde bestimmt, indem die tatsächliche Höhe h_{real} mit einer theoretisch aus dem Biovolumen (100 % Dichte) berechneten hypothetischen Höhe $h_{theoretisch}$ nach der folgenden Formel korreliert wurde:

$$\phi = \frac{h_{real} - h_{theoretisch}}{h_{real}} \times 100 \quad (1)$$

Das Raumportal wies eine Wiederholgenauigkeit von 500 μm auf. Um eine weitestgehende Automatisierung der Datenerfassung und -prozessierung zu ermöglichen, waren die OCT-Bilder größer (von oben gesehen) als der eigentliche Kultivierungskanal. Aus diesem Grund mussten seitlich des Kanals Bildteile abgeschnitten werden, damit diese nicht in die Berechnungen einbezogen werden. Um die Automatisierung dieses Schrittes zu ermöglichen, wurden nur 50 % des jeweiligen Kultivierungskanals ausgewertet. Somit sind die Seitenwände nicht in die Berechnung von Biovolumen, Biofilmhöhe,

Oberflächenbedeckung und Porosität eingegangen. Lediglich die Höhenkarten zeigten den gesamten Kanal.

2.3.2.2 Zellviabilitätsassay

Zur Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen in Biofilmen, welche in mikrofluidischen bioelektrochemischen Durchflussreaktoren kultiviert wurden, wurde eine Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung (Lebend-Tot-Färbung) angewendet. Die Biofilme wurden mit phosphatgepufferter Salzlösung (siehe Tab. 20) gewaschen. Diese Lösung und alle nachfolgenden Lösungen wurden 20 Minuten lang im Dunkeln mit einer Flussrate von 4 mL h^{-1} mittels einer Spritzenpumpe (LA160, Landgraf Laborsysteme HLL, Langenhagen) durch die Reaktoren gepumpt. Für die Färbelösung wurden $4,5 \text{ }\mu\text{L}$ Propidiumiodidlösung (20 mM in Dimethylsulfoxid) und $3 \text{ }\mu\text{L}$ Syto9 (5 mM in ddH_2O ; beide von Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) zu 3 mL PBS hinzugefügt. Schließlich wurden die Reaktoren erneut mit PBS gewaschen. Mikroskopische Aufnahmen wurden mit einem Leica DM5500B-Mikroskop aufgenommen, das mit einer Leica K5-14401820-Kamera und der Leica Application Suite X Software Version 3.8.0.26413 (Leica Microsystems, Wetzlar) ausgestattet war. Zunächst wurden Bilder der Biofilme mit einem Tauchobjektiv (HC APO L U-V-I 63x/0.90 WATER UV, Leica Microsystems, Wetzlar) aufgenommen, indem die Elektrode vorsichtig aus dem Kultivierungskanal entfernt und in eine Petrischale mit

Tab. 20: 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

PBS gelegt wurde. Um das Verhältnis der stoffwechselaktiven Zellen im Vergleich zu den Zellen mit beschädigter Membran (tote Zellen) innerhalb der Biofilm-Matrix zu bestimmen, wurde der Biofilm mit PBS und einer Pipette von der Elektrode abgespült. Der Biofilm wurde durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert, auf einen Objektträger übertragen und mit dem Objektiv N PLAN 100x/1,25 OIL (Leica Microsystems, Wetzlar) abgebildet. Die Elektrode wurde in eine Petrischale mit PBS gelegt, und der verbleibende Biofilm wurde ebenfalls mit dem Tauchobjektiv untersucht. Um die Lebensfähigkeit der Biofilmschichten in Anodennähe zu beurteilen, wurde der Biofilm mit einem Skalpell von der Elektrode entfernt. Der Biofilm wurde kopfüber auf einen Objektträger gelegt und ein Deckglas auf den ehemals unteren Teil des Biofilms gelegt. Die Bilder wurden mit dem Objektiv N PLAN 100x/1,25 OIL (Leica Microsystems, Wetzlar) aufgenommen. Der verbleibende Biofilm auf der Anode wurde auf die gleiche Weise wie zuvor sichtbar gemacht. Für alle Aufnahmen wurden die Filterwürfel L5 ET (k) und Y3 ET (k) der Chroma Technology Corporation (Vermont, USA) verwendet. Der Prozentsatz an toten und lebenden Zellen wurde mit (Fiji Is Just) ImageJ Version 2.1.0/1.53 (Schindelin *et al.*, 2012) bestimmt. Zu diesem Zweck wurden die Bilder in 2^8 konvertiert, mit einem geeigneten Schwellenwert (0-255) binarisiert und die Prozentsätze der lebenden und toten Zellen mit Formel 2 bzw. 3 bestimmt.

$$A_{lebend} = \frac{\sum Pixel_{lebend}}{\sum Pixel_{lebend} + \sum Pixel_{tot}} \cdot x100 \quad (2)$$

$$A_{tot} = \frac{\sum Pixel_{tot}}{\sum Pixel_{tot} + \sum Pixel_{lebend}} \cdot x100 \quad (3)$$

2.3.2.3 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

Zur Lokalisation verschiedener Bakterienarten innerhalb eines Biofilms wurde Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) angewandt. Mit Hilfe dieser molekularbiologischen Methode können DNA und RNA *in-situ* in biologischen Proben nachgewiesen werden. Die Methode beruht auf der Hybridisierung von zur gesuchten Basenfolge komplementären Nukleinsäuresonden, welche fluoreszenzmarkiert sind. Zur Unterscheidung von *S. oneidensis* und *G. sulfurreducens* wurden die Sonden SHEW227 (Huggett *et al.*, 2008) und GEO2 (Richter *et al.*, 2007) verwendet. Ziel dieser Sonden ist die 16S rRNA, als Bestandteil der Ribosomen. Dieser Bereich ist hoch konserviert und erlaubt dadurch eine phylogenetische Unterscheidung verschiedener Arten, zudem kann durch die Bindung der zielgerichteten rRNA-Oligonukleotidsonden eine Aussage über die Aktivität der Zellen getroffen werden, da das FISH-Signal mit dem Vorkommen an Ribosomen korreliert.

Die Durchführung erfolgte im Wesentlichen nach den Methoden von Amann *et al.* (1990) mit den in den Tabellen 21 - 23 aufgeführten Puffern und Lösungen. Das gesamte FISH-Verfahren wurde innerhalb der mikrofluidischen Reaktoren durchgeführt, indem die einzelnen Lösungen nach Ende des Experiments durch den Kultivierungskanal gepumpt wurden. Da das Protokoll auf der Fixierung von kultivierten Zellen beruht, stellt diese Analysemethode eine Endpunktanalyse dar. Alle Lösungen wurden an aktive 2/2 normal geschlossene Ventile (SMV-2R-BN1F; Takasago Kōryō Kōgyō, Tokio, Japan) angeschlossen. Die Steuerung der Ventile erfolgte über eine eigens angefertigte Bedieneinheit. Über Y-Verzweigungen wurden alle Lösungen in einem einzigen Auslassschlauch zusammengeführt, welcher an eine Reglo ICC Peristaltikpumpe (ISMATEC Industry Solution, Grevenbroich) angeschlossen wurde. Die Lösungen wurden mit einer Geschwindigkeit von 4 mL h^{-1}

in den mikrofluidischen Reaktor gefördert. Eine tabellarische Auflistung der einzelnen Schritte ist in Tabelle 24 zu finden. Die Automatisierung des FISH-Protokolls erfolgte in Zusammenarbeit mit Henning Klein und René Wurst.

Tab. 21: Hybridisierungspuffer für Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH).

<i>Lösung</i>	<i>Menge in ml</i>	
	<i>20 % Formamid</i>	<i>40 % Formamid</i>
5 M NaCl	1,08	1,08
1 M TRIS HCl (pH 8)	0,12	0,12
20 % SDS (w/v)	0,003	0,003
Formamid	1,2	2,4
ddH ₂ O	3,6	2,4

Tab. 22: Waschpuffer für Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH).

<i>Lösung</i>	<i>Menge in ml</i>	
	<i>20 % Formamid</i>	<i>40 % Formamid</i>
5 M NaCl	4,5	0,46
1 M TRIS HCl (pH 8)	1	1
20 % SDS (w/v)	0,025	0,025
0,5 M EDTA (pH 8)	0,5	0,5
ddH ₂ O	3,6	2,4

Tab. 23: Zusammensetzung des Einbettpuffers.

<i>Substanz</i>	<i>ml l⁻¹</i>
Citiflour	11
Vectashield	2
PBS 1x (siehe Tab. 20)	1

Tab. 24: Protokoll für die automatisierte Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH).

Arbeitsschritt	Lösung	Flussrate [$\mu\text{l min}^{-1}$]	Pumpzeit [min]	Inkubation [min]	Temp. [$^{\circ}\text{C}$]
Fixierung	4 % Formaldehyd in PBS (siehe Tab. 20)	67	35	-	RT ^a
Permeabilisierung	0,1 M HCl	67	29	-	RT ^a
Waschen	ddH ₂ O	-	-	10	RT ^a
Hybridisierung I	13,5 $\mu\text{l ml}^{-1}$ 50 ng μl^{-1} SHEW227-Sonde (Huggert <i>et al.</i> , 2008) in 40 % Hybridisierungspuffer (siehe Tab. 21)	67	29	-	RT ^a
Waschen	Waschpuffer 40 % (siehe Tab. 22)	-	-	90	48
Hybridisierung II	Jeweils 13,5 $\mu\text{l ml}^{-1}$ 50 ng μl^{-1} GEO2-Sonde (Richter <i>et al.</i> , 2007), H-GEO1 und H-GEO2 (50 ng μl^{-1}) in 20 % Hybridisierungspuffer (siehe Tab. 21)	67	29	-	48
Waschen	Waschpuffer 20 % (siehe Tab. 22)	67	29	-	48
Waschen	SSC (7 M NaCl, 14 mM C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ x 2 H ₂ O)	67	29	-	RT ^a
Gegenfärbung	1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ DAPI	67	29	-	48
Einbetten	Einbettpuffer (siehe Tab. 23)	-	-	5	48
Lagerung	-	67	29	-	RT ^a
a. Raumtemperatur	-	-	-	∞	4

2.4 Mathematische Auswertungen und Graphen

2.4.1 Mathematische Auswertungen

Mathematische Auswertungen erfolgten mit Origin 2021 (OriginLab, Massachusetts, USA).

2.4.2 Erstellung von Graphen

Für graphische Darstellungen wurde Origin 2021 (OriginLab, Massachusetts, USA) genutzt. Abbildungen wurden mit Hilfe von GIMP 2.1 (*GNU Image Manipulation Program*, <https://www.gimp.org>) und BioRender (<https://www.biorender.com>) erstellt.

3 Ergebnisse

Obwohl *S. oneidensis* der am besten untersuchte Modellorganismus in Bezug auf die Reduktion extrazellulärer Elektronenakzeptoren ist, sind die Elektronentransferraten um ein Vielfaches niedriger als bei *G. sulfurreducens* (Engel *et al.*, 2019; Klein *et al.*, 2023). Diese Arbeit basiert auf der Hypothese, dass dieser Unterschied vor allem in der konduktiveren EZM von *G. sulfurreducens* begründet liegt. Daher sollte der Einfluss verschiedener genetischer Faktoren auf die Biofilmentwicklung von *S. oneidensis* fundamental untersucht werden, um zu ermitteln, ob diese zur Ausbildung leitfähigerer Biofilme und damit zur Erhöhung der Reduktionsraten extrazellulärer Elektronenakzeptoren beitragen können. Um in der Lage zu sein, Biofilmentwicklung und Stromproduktion direkt miteinander zu korrelieren, sollte zunächst eine mikrofluidische Kultivierungsplattform mit integrierter automatisierter dreidimensionaler Bildgebung etabliert werden. Die Validierung der Plattform erfolgte durch Untersuchung einer Modellgemeinschaft aus *G. sulfurreducens* und *S. oneidensis*. Da mit *Geobacter*-Spezies bis heute die höchsten nachweisbaren Stromausbeuten erzielt werden, sollen diese Untersuchungen zudem einen Maßstab liefern, welche Stromausbeuten unter natürlichen Bedingungen erreicht werden können.

3.1 Untersuchung der Biofilmentwicklung einer mikrobiellen Modellgemeinschaft

Ziel war es die Biofilmentwicklung einer mikrobiellen elektroaktiven Modellgemeinschaft aufzuklären. Die Modellgemeinschaft hierfür stellte eine *S. oneidensis*/*G. sulfurreducens*-Cokultur dar. Um Unterschiede in der Biofilmentwicklung der beiden

Modellorganismen zu ermitteln, wurden zudem Einzelkultur-Biofilme untersucht.

3.1.1 Quantitative Analyse der Elektroaktivität von *S. oneidensis*- und *G. sulfurreducens*-Biofilmen sowie eines Cokultur-Biofilms

Kohlenstoff- und Elektronenquelle für die Einzelkulturversuche war Laktat für die Kultivierung von *S. oneidensis* und Acetat für die Kultivierung von *G. sulfurreducens*. *S. oneidensis* zeigte während der Inokulation eine Spitzenstromdichte von $\approx 360 \pm 170 \text{ nA cm}^{-2}$ (Datensatz von René Wurst, Abb. 12a). Danach fiel die Stromdichte stark ab und pendelte sich nach etwa 26 Stunden bei $150 \pm 20 \text{ nA cm}^{-1}$ ein. Es konnten keine Biofilmdaten erhoben werden, da die Fähigkeit von *S. oneidensis* anodische Biofilme auszubilden eher begrenzt ist (Kitayama *et al.*, 2017; Baron *et al.*, 2009; Rosenbaum *et al.*, 2012) und die Biofilmdicke im untersten Bereich der Messempfindlichkeit des OCT-Geräts lag ($8 \times 8 \times 5,5 \text{ }\mu\text{m}$). Nach der Inokulation von *G. sulfurreducens* konnte zunächst eine etwa 24-stündige Latenzphase beobachtet werden, gefolgt von einer logarithmischen Wachstumsphase, die nach 72 h zu einem stationären Plateau von etwa $200 \pm 10 \text{ }\mu\text{A cm}^{-2}$ führte (Abb. 12b). Auffallend war, dass nach 24 h die Stromdichte mit $4 \pm 3 \text{ }\mu\text{A cm}^{-2}$ noch vergleichsweise niedrig war, die Biofilmhöhe und das Biovolumen aber bereits Werte von $10,8 \pm 8,4 \text{ }\mu\text{m}$ bzw. $0,6 \pm 0,4 \text{ mm}^3 \text{ cm}^{-2}$ erreichten, was etwa einem Drittel der Werte nach 72 h entspricht, als die Stromdichte ihr Plateau erreichte. Somit konnte im Verlauf des Experiments keine lineare Korrelation zwischen Biofilmentwicklung und der Stromdichte beobachtet werden. Für die Cokultivierung von *S. oneidensis* und *G. sulfurreducens* sollte eine Abhängigkeit der beiden Organismen etabliert werden. Aus diesem Grund wurde Laktat als einziger Elektronendonator und Kohlenstoffquelle eingesetzt. Summers *et al.* (2012) konnten zeigen, dass Laktat vom *G. sulfurreducens*-Wildtyp nicht

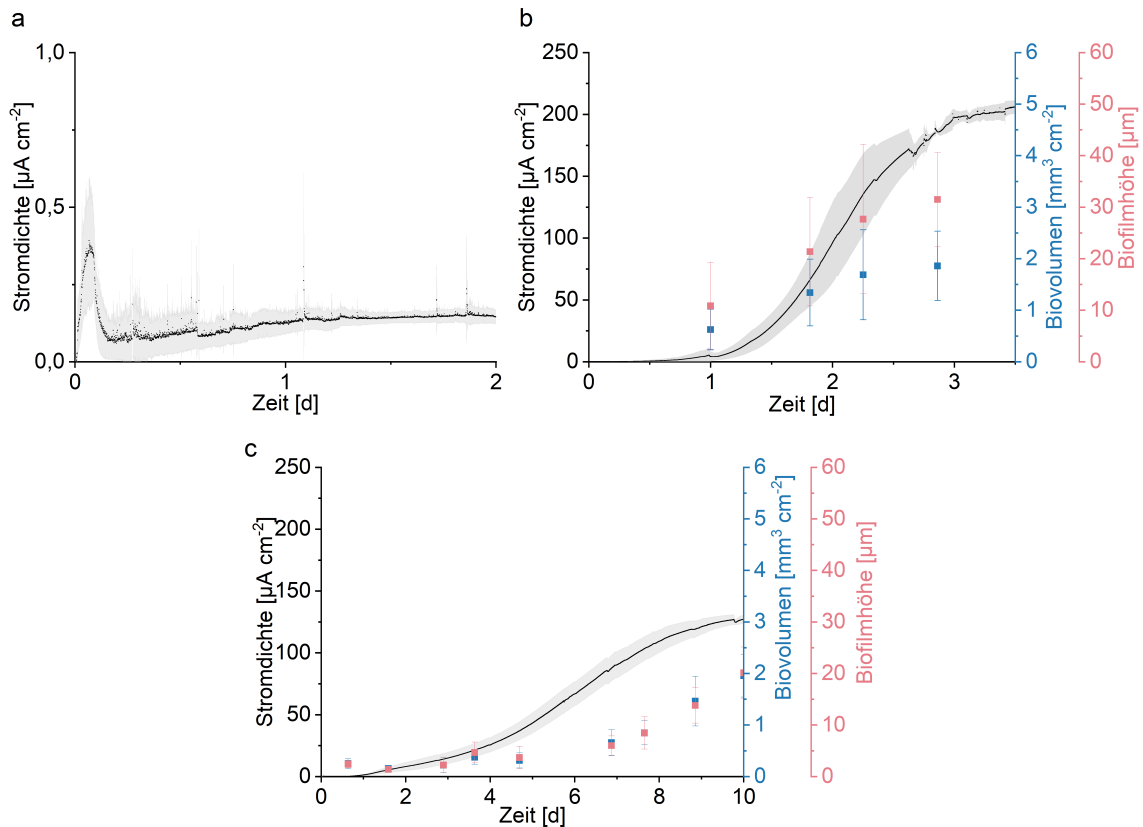


Abb. 12: **Anodische Biofilmentwicklung von *S. oneidensis* (a), *G. sulfurreducens* (b) und einer *S. oneidensis*/*G. sulfurreducens*-Cokultur (c) im Vergleich.** Die Biofilme wurden in mikrofluidischen mikrobiellen Elektrolysezellen (MEZ) kultiviert. Die chronoamperometrische Untersuchung erfolgte unter Anlegen einer Spannung von 0 V *vs.* SHE bis zu dem Zeitpunkt, an dem die Stromdichte ein Plateau erreichte. Biofilmhöhe und Biovolumen wurden mittels optischer Kohärenztomographie (OCT) untersucht. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von unabhängigen Versuchen ($n = 3$) dar.

verstoffwechselt werden kann und dass nur eine langfristige Laborevolution zu einer Anpassung an Laktat als Kohlenstoffquelle und Elektronenquelle führen kann. Die Kultivierung der Cokultur führte zu deutlichen Unterschieden im Vergleich zu den Einzelkulturversuchen (Abb. 12c). Die Stromdichte der Cokultur wies eine Latenzphase von etwa 24 h auf und ein Plateau von $130 \pm 3 \mu\text{A cm}^{-2}$ konnte nach neun bis zehn Tagen erreicht werden. Die Biofilmhöhe und das Biovolumen blieben in den ersten fünf Tagen eher gering und nahmen ab dem siebten Tag linear zu, bis an Tag zehn eine Biofilmhöhe und ein Biovolumen von $20 \mu\text{m}$ bzw. $2 \text{ mm}^3 \text{ cm}^{-2}$ erreicht

wurden. Während bei *G. sulfurreducens* bereits vor dem exponentiellen Anstieg der Stromdichte ein ausgeprägtes Biofilmwachstum beobachtet wurde, blieb die Cokultur in Bezug auf das Biofilmwachstum hinter der Entwicklung der Stromdichte zurück.

Da für *S. oneidensis* keine Biofilmdaten generiert werden konnten, sind in Abbildung 13 nur von *G. sulfurreducens* und der Cokultur weitergehende Biofilmanalysen dargestellt. Die Biofilmporosität beschreibt den Anteil an Hohlräumen in der Biofilmmatrix. Je kompakter ein Biofilm ist, desto weniger Hohlräume hat er. Während die Porosität des Biofilms von *G. sulfurreducens* während des gesamten Experiments etwa 36 - 40 % betrug, nahm sie in der Cokultur von etwa 21 ± 18 % zu Beginn auf $6,5 \pm 5,5$ % am Ende des Experiments ab (Abb. 13a-b). An dieser Stelle sei erwähnt, dass die Standardabweichung im Allgemeinen mit zunehmendem Biovolumen abnimmt, da Störsignale bei der OCT-Bildgebung nie vollständig vermieden werden können und dann einen geringeren Einfluss haben. Die Bedeckung der Elektrodenoberfläche (Abb. 13c-d) nahm mit der Stromdichte zu und erreichte bei maximaler Stromdichte sowohl für *G. sulfurreducens* allein als auch für die Cokultur 75 % Bedeckung. In Abbildung 13e-f ist neben der Stromdichte die erste Ableitung der Stromdichte (grün), die Elektroaktivität pro Biovolumen (blau) sowie pro Biofilmhöhe (rot) dargestellt. Ersteres entspricht der Änderung der Stromdichte pro Stunde und Elektroaktivität ist hier definiert als der pro Kubikmillimeter Biofilmvolumen bzw. pro Mikrometer Biofilmhöhe erzeugte Strom. Während bei *G. sulfurreducens* die erste Ableitung der Stromdichte an Tag 2 ein Maximum zeigte und die Elektroaktivität kontinuierlich anstieg, verhielt sich die Aktivität der Cokultur ähnlich wie die erste Ableitung der Stromdichte und zeigte einen Spitzenwert zwischen Tag 5 und 7. Das Maximum der Stromentwicklung von *G. sulfurreducens* an Tag 2 korrelierte mit der Wachstumsrate des Biofilms.

3 Ergebnisse

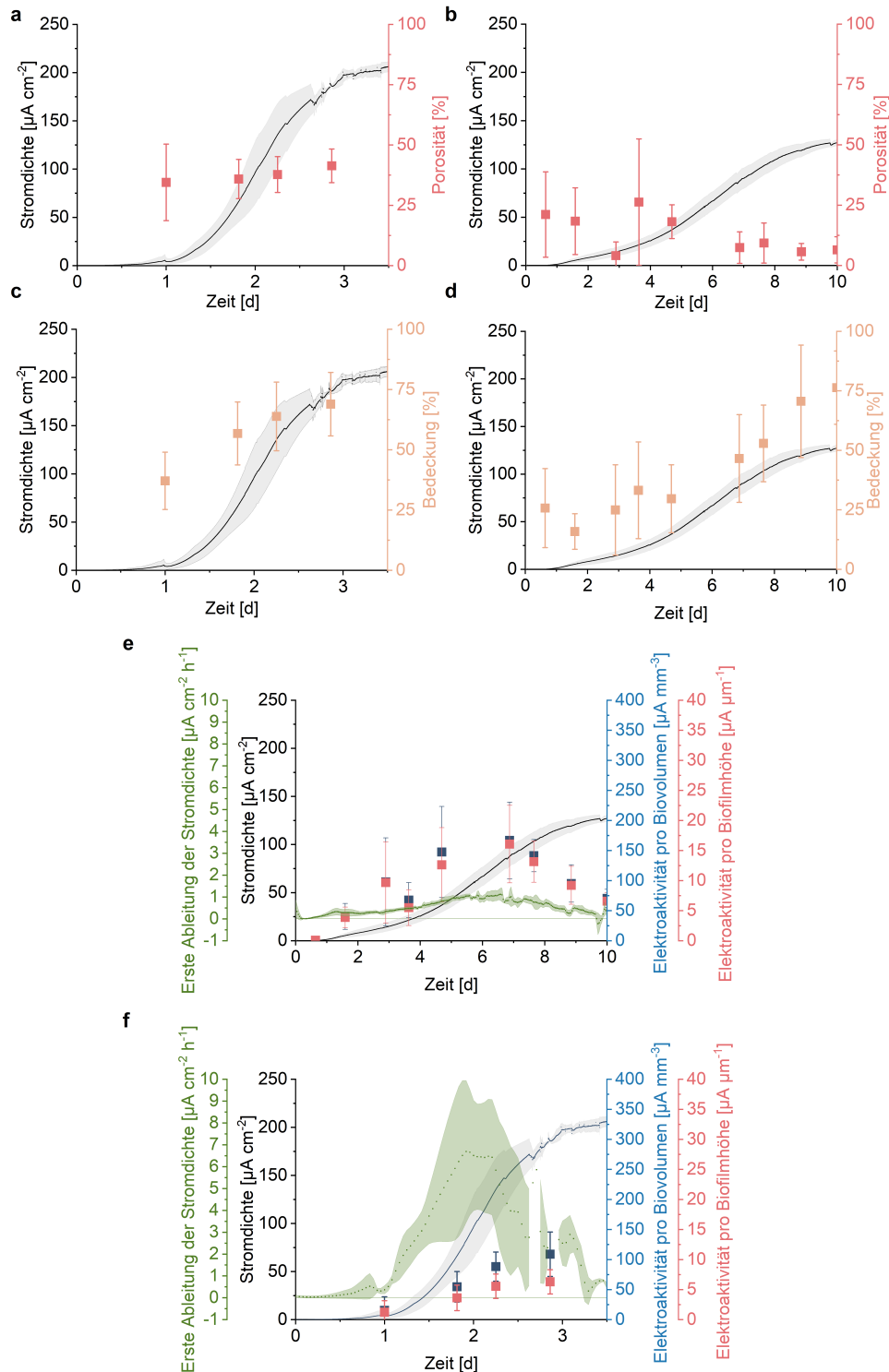


Abb. 13: Weitergehende Biofilmanalysen von *G. sulfurreducens* (a, c und f) und einer *S. oneidensis*/*G. sulfurreducens*-Cokultur (b, d und e). Biofilmporosität (a-b), Anodenbedeckung (c-d) und die erste Ableitung der Stromdichte, Elektroaktivität pro Biovolumen sowie Elektroaktivität pro Biofilmhöhe (e-f) sind im Vergleich zur Stromdichte über die Zeit aufgetragen. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von unabhängigen Versuchen ($n = 3$) dar.

3.1.2 Eine FISH-Analyse zeigt ein spezifisches Verteilungsmuster der *S. oneidensis*- und *G. sulfurreducens*-Zellen

Um die räumliche Verteilung und Verhältnisse der *S. oneidensis*- und *G. sulfurreducens*-Zellen zu untersuchen, wurde ein Cokultur-Biofilm mittels FISH und anschließender CLSM analysiert (Abb. 14-15). Hierbei konnte ein Verhältnis von 33 ± 11 % *S. oneidensis*-Zellen zu 67 ± 10 % *G. sulfurreducens*-Zellen ermittelt werden (Abb. 14a). Da diese Daten jedoch durch Pixelzählung der binarisierten CLSM-Bilder gewonnen wurden, könnte die tatsächliche Anzahl der *G. sulfurreducens*-Zellen aufgrund ihrer geringeren Zellgröße (d. h. weniger Pixel pro Zelle) noch höher gewesen sein. Trägt man das Verhältnis der beiden Organismen gegen die Biofilmtiefe auf (Abb. 14b), so zeigt sich, dass in den oberen Biofilmschichten (0 bis -5 μm) die Häufigkeit beider Organismen gleich verteilt war. Mit zunehmender Nähe zur Anode verschiebt sich dieses Gleichgewicht zugunsten von *G. sulfurreducens*, bis in

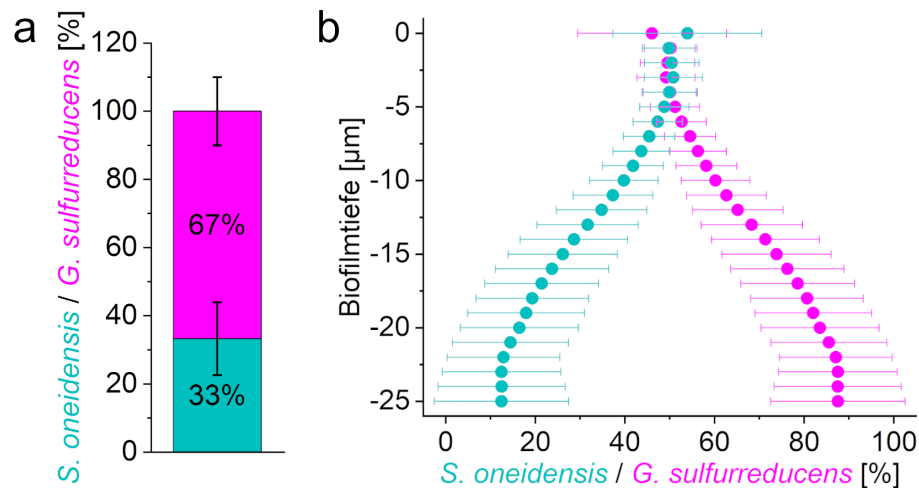


Abb. 14: **Quantitative Ergebnisse einer räumlich aufgelösten FISH-Analyse eines *S. oneidensis*/*G. sulfurreducens*-Biofilms.** In **a** ist das Verhältnis von *S. oneidensis*- zu *G. sulfurreducens*-Zellen über den gesamten Biofilm und in **b** gegen die Biofilmtiefe dargestellt. 0 μm ist hier die äußere Biofilmschicht und die Zahlenwerte werden mit zunehmender Nähe zur Anode immer negativer.

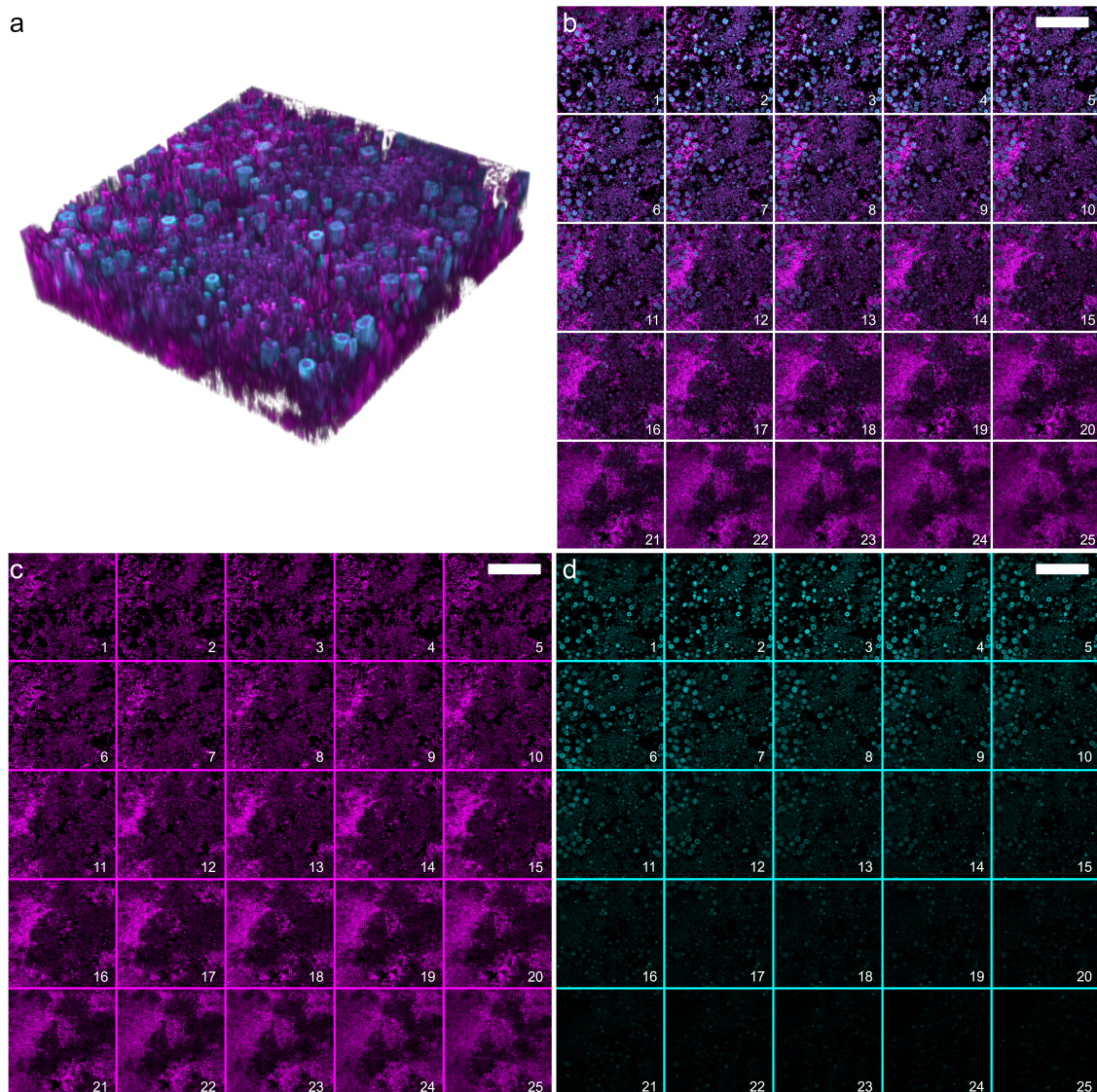


Abb. 15: **Räumlich aufgelöste FISH-Analyse eines *S. oneidensis* / *G. sulfurreducens*-Biofilms.** In **a** ist eine dreidimensionale Darstellung gezeigt und in **b-d** sind die einzelnen Schichten dieser Ansicht gezeigt. *G. sulfurreducens* ist hierbei in **c**, *S. oneidensis* in **d** und eine Überlagerung der beiden in **b** dargestellt. Der weiße Balken stellt 50 μm dar und die Bilder wurden in Abständen von je 1 μm aufgenommen.

einer Tiefe von $-25 \mu\text{m}$ $88 \pm 15 \%$ der vorhandenen Organismen *G. sulfurreducens* sind. In Abb. 15 ist außerdem erkennbar, dass die *G. sulfurreducens*-Zellen in der gesamten Biofilmmatrix ein dreidimensionales Netzwerk gebildet haben, in das tubuläre *S. oneidensis*-Kolonien mit einem Durchmesser von $\approx 5 \mu\text{m}$ und einer Höhe von $\approx 10 \mu\text{m}$ eingebettet waren. In den Einzelaufnahmen ist erkennbar (b-d),

dass diese Röhren orthogonal zur Anode verliefen und nicht in direktem Kontakt mit ihr standen. Jeder *S. oneidensis*-Tubulus war direkt von *G. sulfurreducens*-Zellen umgeben und teilweise durchdrungen. Die Röhren waren jeweils $\approx 2,5 \mu\text{m}$ voneinander entfernt und die aktivsten (FISH-Signalintensität korreliert mit der Ribosomenhäufigkeit) *G. sulfurreducens*-Zellen waren direkt neben den *S. oneidensis*-Tubuli lokalisiert.

3.1.3 Untersuchung der Zellviabilität innerhalb eines

S. oneidensis / *G. sulfurreducens*-Cokultur-Biofilms

Die Ergebnisse der FISH-Analyse geben Auskunft über das raum aufgelöste Vorkommen der beiden Bakterienarten. Zu einem gewissen Grad können auch Aussagen über die Vitalität getroffen werden, da das FISH-Signal mit dem Vorkommen an Ribosomen korreliert. Um quantitative Aussagen über die Vitalität in verschiedenen Schichten des Biofilms treffen zu können, wurde zusätzlich eine Lebend-Tot-Färbung eines Cokultur-Biofilms durchgeführt. Abbildung 16a zeigt das Verhältnis von lebenden zu toten Zellen an verschiedenen Positionen des mikrofluidisch kultivierten Biofilms und b - e zeigen Beispielbilder an den entsprechenden Positionen. Während die äußerste Schicht des Biofilms (b) fast ausschließlich aus toten Zellen bestand, zeigten die Biofilmschichten nahe der Anodenoberfläche eine Lebensfähigkeit von etwa 50 % (d - e). Die Biofilmdispersion (c), die einen Querschnitt des gesamten Biofilms von der obersten Schicht bis zur Anodenoberfläche darstellt, wies eine Lebensfähigkeit von $82 \pm 12\%$ auf. Bedenkt man, dass die äußerste und die innerste Schicht eine Lebensfähigkeit von $2 \pm 0,5 \%$ bzw. 50 % aufwiesen, bedeutet dies, dass die Lebensfähigkeit der Zellen in der Mitte des Biofilms über $82 \pm 12\%$ lag. Somit deuten die Ergebnisse darauf hin, dass unter den hier herrschenden streng kontrollierten

Bedingungen die meiste Aktivität in der Mitte des Biofilms zu finden war.

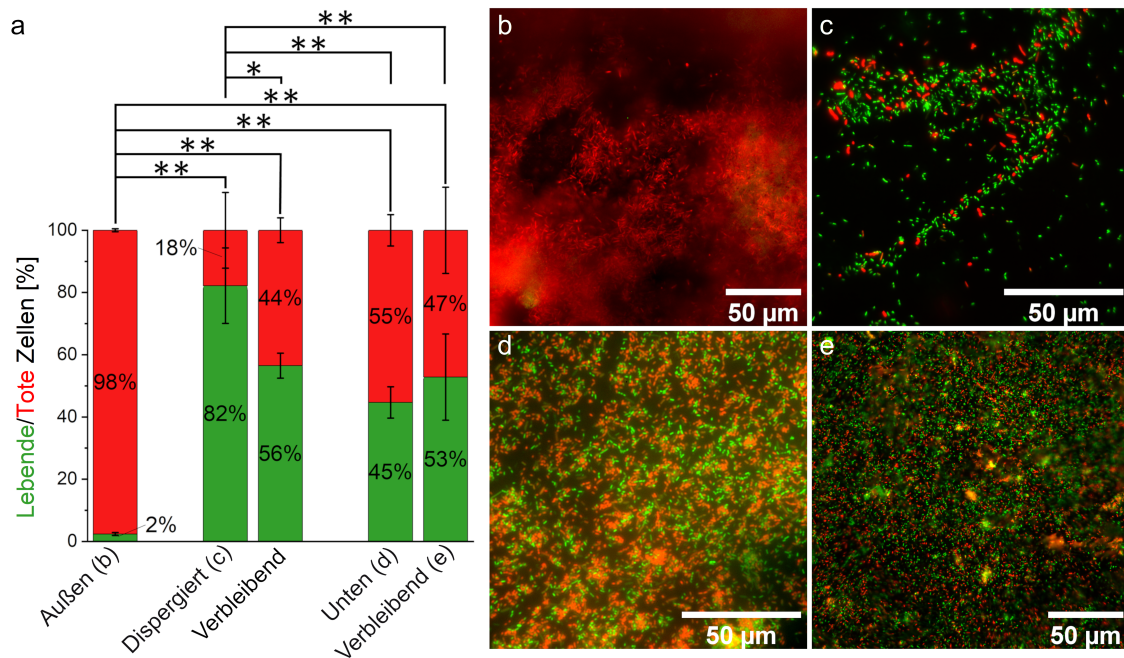


Abb. 16: **Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung von anodischen *S. oneidensis* / *G. sulfurreducens*-Cokultur-Biofilmen.** In **a** ist die prozentuale Verteilung von lebenden und toten Zellen dargestellt und in **b - e** sind repräsentative Mikroskopbilder von toten (rot) und lebenden (grün) Zellen im Kompositbild zu sehen. Es wurden zwei Anoden untersucht. Bei beiden Anoden wurde der Biofilm zunächst von oben untersucht ("außen"; b). Anschließend wurde der Biofilm mit PBS-Lösung und einer Pipette von einer Anode abgespült und der dispergierte Biofilm untersucht ("dispergiert"; c). Von der anderen Anode wurde der Biofilm mit einer Skalpell entfernt und der Biofilm von unten ("unten"; d) und der verbleibende Biofilm auf der Anode ("verbleibend"; e) untersucht. Die Fehlerbalken der ersten Säule ("außen") in **a** stellen die Standardabweichung von zwei unabhängigen Replikaten dar ($n = 2$). Die Fehlerbalken aller anderen Säulen stellen die Standardabweichung technischer Replikate dar ($n_{\text{dispergiert}} = 7$ und $n_{\text{verbleibend}} = 2$; $n_{\text{unten}} = 9$ und $n_{\text{verbleibend}} = 7$). Sternchen stehen für signifikante Unterschiede (ungepaarter t-Test: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

3.2 Einfluss verschiedener genetischer Faktoren auf die

Biofilmentwicklung von *Shewanella oneidensis*

Es sollte der Einfluss verschiedener genetischer Faktoren auf die Biofilmentwicklung von *S. oneidensis* unter Verwendung verschiedener Elektronenakzeptoren untersucht

werden. Im Folgenden wird zunächst die Untersuchung von *S. oneidensis* MR-1 $\Delta\lambda$ als Wirtsstamm beschrieben (Abschnitt 3.2.1), gefolgt von der Untersuchung verschiedener genetischer Faktoren (Abschnitte 3.2.2 und 3.2.3).

3.2.1 *S. oneidensis* MR-1 $\Delta\lambda$ als Wirtsstamm

Der Einfluss der Deletion des Lambda-Phagen auf die Biofilmbildung unter kontinuierlichen Flussbedingungen wurde unter anoxischen Bedingungen mit Fumarat als Elektronenakzeptor untersucht (Abb. 17). Der Kontrollstamm wies eine Latenzphase von etwa 5 h auf, woraufhin ein lineares Wachstum bis zu einem Biovolumen von $\approx 11,5 \text{ mm}^3 \text{ cm}^{-2}$ nach 25,5 h zu beobachten war. Die Deletionsmutante hingegen wies eine Latenzphase von mehr als 20 h auf und erreichte nach 31,5 h nur ein

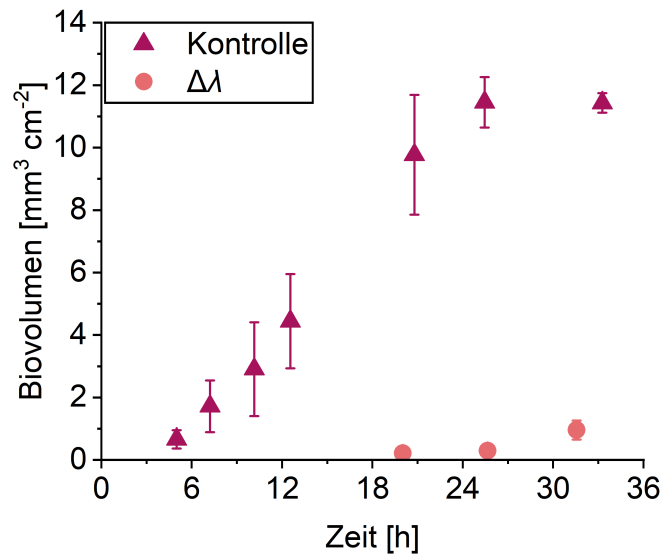


Abb. 17: **Einfluss der Deletion des Lambda-Phagen auf die Biofilmbildung von *S. oneidensis* unter kontinuierlichen Flussbedingungen.** Die Biofilme wurden unter anoxischen Bedingungen mit Fumarat als Elektronenakzeptor in mikrofluidischen Fließzellen kultiviert. Das Biovolumen wurde mittels optischer Kohärenztomographie (OCT) untersucht. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von unabhängigen Versuchen ($n = 3$) dar. Kontrolle = JG1469 und $\Delta\lambda$ = JG1475.

Biovolumen von $\approx 1 \text{ mm}^3 \text{ cm}^{-2}$. In diesem Versuch wurden die Reaktoren mit der Glasseite nach oben kultiviert und OCT-Bilder wurden von der PDMS-Seite aufgenommen. Aufgrund der geringeren Wachstumsgeschwindigkeit des Deletionsstammes im Vergleich zum Kontrollstamm wurde die Bildaufnahme des PDMS-Biofilms durch den auf dem Glas wachsenden Biofilm erschwert. Daher wurden alle nachfolgenden mikrofluidischen Versuche (mit Sauerstoff und Fumarat als Elektronenakzeptor) mit Reaktoren durchgeführt, die mit der Glasseite nach oben kultiviert wurden. Die OCT-Bildaufnahme erfolgte weiterhin von der PDMS-Seite.

3.2.2 Untersuchung von WbpA und WbpP als mögliche Faktoren für die Biofilmbildung bei *Shewanella oneidensis*

Edel *et al.* (2021) konnten zeigen, dass Riboflavin bei *S. oneidensis* als Quorum-Sensing-Molekül wirkt und die Biofilmbildung unter anoxischen Bedingungen beschleunigt. Es wurde nachgewiesen, dass Riboflavin konzentrationsabhängig die Expression von *speC* induziert. Eine SpeC-Überexpression führte wiederum zu einer Reihe von differentiell regulierten Proteinen, darunter WbpP. WbpP codiert für eine Uridinphosphat-N-Acetylglucosamin-C4-Epimerase, für welche eine direkte Funktion bei der EPS-Bildung gezeigt werden konnte (Lee *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2006). Aus diesem Grund sollte die Auswirkung einer *wbpP*-Überexpression auf die anaerobe Biofilmbildung sowie auf die Stromproduktion analysiert werden. Darüber hinaus sollte die Untersuchung auf *wbpA* ausgeweitet werden, da sich dieses Gen offenbar zusammen mit *wbpP* in einem Operon befindet (Daten nicht gezeigt).

3.2.2.1 Einfluss der Überexpression von *wbpA* und *wbpP* auf die anoxische Biofilmbildung

Um den Einfluss der Überexpression von *wbpA*, *wbpP* und der Kombination von beiden auf die Biofilmbildung systematisch zu untersuchen, wurden Biofilme mit Laktat als Elektronendonator und Fumarat als Elektronenakzeptor mittels mikrofluidischem Durchflusssystem kultiviert. Die Überexpression erfolgte mit Hilfe eines durch Arabinose induzierbaren Expressionsplasmids und als Kontrolle wurde ein Stamm mit einem leeren Plasmid untersucht. In Abb. 18 sind die Biofilme als farbcodierte Höhenkarten gezeigt. Diese Darstellung zeigt, dass die Biofilmarchitektur der untersuchten Stämme von der Architektur des Kontrollstammes abwich. Im Vergleich zur Kontrolle schienen alle überexprimierenden Stämme eine längere Latenzphase aufzuweisen, bevor die Biofilmbildung begann. Der Kontrollstamm bildete Türme, die im Verlaufe der Zeit in konfluentere Biofilmstrukturen übergingen. Im Vergleich dazu schien der *wbpP*-überexprimierende Stamm schmalere Kolonien zu bilden, die in weniger homogene Biofilmstrukturen zusammenwuchsen. Der *wbpA*-überexprimierende Stamm bildete ebenfalls dünnere Türme, wobei diese jedoch über die Zeit zu einer glatteren Struktur zusammenwuchsen. Die Coexpression der beiden Gene schien zu Strukturen zu führen, die den Durchschnitt der Expression beider Gene allein darstellen. Im Vergleich zur *wbpP*-Überexpression waren die Strukturen des *wbpA*-überexprimierenden Stammes dünner und schienen glattere Biofilmschichten zu bilden.

Dieser qualitative Eindruck spiegelt sich auch in den quantitativen Daten wieder (Abb. 19). Nach 50 h Kultivierung zeigten alle Mutanten ein deutlich geringeres Biovolumen im Vergleich zum Kontrollstamm und nach 35 h eine geringere Biofilmhöhe. Zu diesem Zeitpunkt waren die Oberflächen aller vier Stämme zu 100 % bedeckt. Die Biofilm-Porosität des *wbpP*-überexprimierenden Stammes war nach 50 Stunden

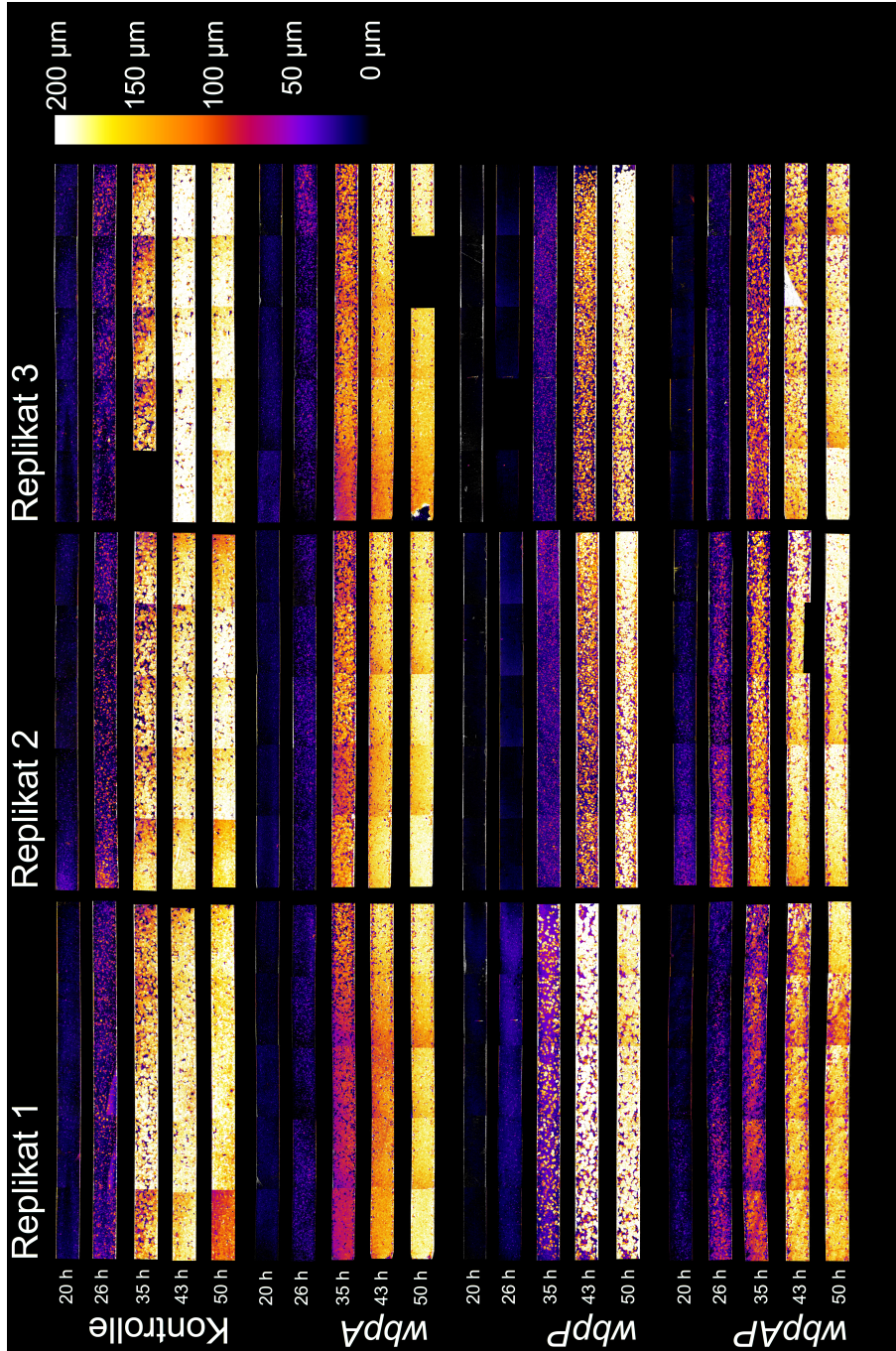


Abb. 18: Qualitative Analyse des Einflusses der *wbpA*-, *wbpP*- sowie der *wbpAP*-Überexpression auf die Biofilmbildung von *S. oneidensis* unter anoxischen Bedingungen mit Fumarat als Elektronenakzeptor. Von jedem Kultivierungskanal wurden fünf Bilder aufgenommen, durch Bearbeitung in farbcodierte Höhenkarten umgewandelt und durch Stitching zu einem Bild kombiniert. Die abgebildeten Kultivierungskanäle haben eine Größe von 3 x 45 mm und entsprechen einer Draufsicht auf den Biofilm, mit der Fließrichtung von links nach rechts. Kontrolle = JG1475, *wbpA* = JG1862, *wbpP* = JG1862 und *wbpAP* = JG1863.

mit der Kontrolle vergleichbar, wobei die *wbpA*- und *wbpAP*-überexprimierenden Stämme eine deutlich geringere Porosität zeigten. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die einzelnen überexprimierten Stämme im Vergleich zum Vorgängerstamm strukturell unterschiedliche Biofilme bildeten.

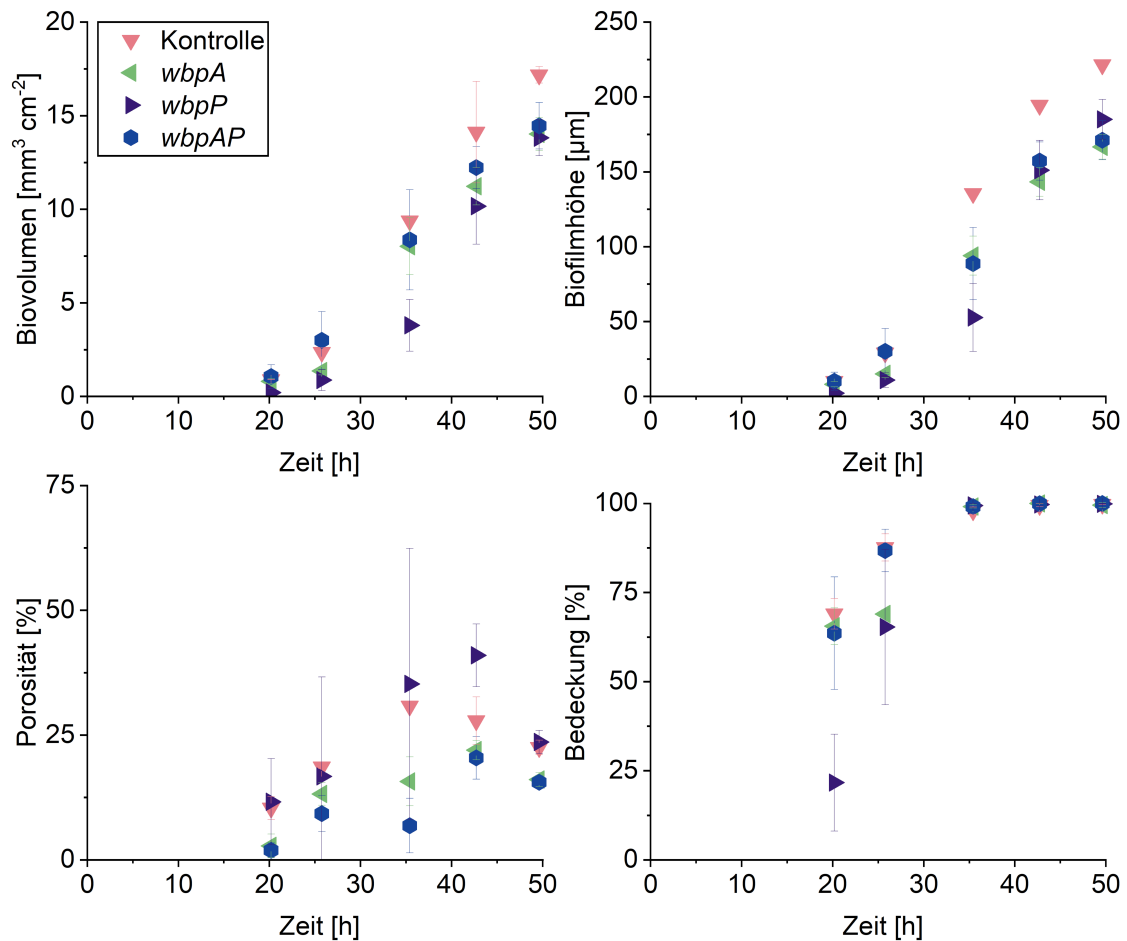


Abb. 19: **Quantitative Analyse des Einflusses der *wbpA*-, *wbpP*- sowie *wbpAP*-Überexpression auf die Biofilmbildung von *S. oneidensis* unter anoxischen Bedingungen.** Die Biofilme wurden mit Laktat als Elektronendonator und Fumarat als Elektronenakzeptor in mikrofluidischen Fließzellen kultiviert. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von unabhängigen Replikaten dar (n = 3). Kontrolle = JG1475, *wbpA* = JG1862, *wbpP* = JG1862 und *wbpAP* = JG1863. Eine statistische Auswertung ist in Tab. A1-A2 zu finden.

3.2.2.2 Einfluss der Überexpression von *wbpA* und *wbpP* auf die Stromproduktion im bioelektrochemischen System

Nachdem der Einfluss der Überexpression von *wbpA*, *wbpP* sowie die Co-Überexpression beider Gene unter anoxischen Bedingungen mit Fumarat als Elektronenakzeptor untersucht wurde, wurde anschließend der Einfluss auf die Stromproduktion mit einer Anode als einzigem terminalen Elektronenakzeptor untersucht. Wie in Abb. 20 gezeigt, hatte die Überexpression einer der beiden Komponenten unter den untersuchten Bedingungen keinen Einfluss auf die Stromerzeugung. Die Überexpression beider Gene zusammen führte jedoch zu einem signifikanten 1,8-fachen Anstieg der Stromdichte im Vergleich zum Kontrollstamm. Biofilmdaten konnten nicht generiert werden, da die Fähigkeit von *S. oneidensis*, anodische Biofilme zu bilden, eher begrenzt ist (Baron *et al.*, 2009; Kitayama *et al.*, 2017; Rosenbaum *et al.*, 2012) und die Biofilmdicke im

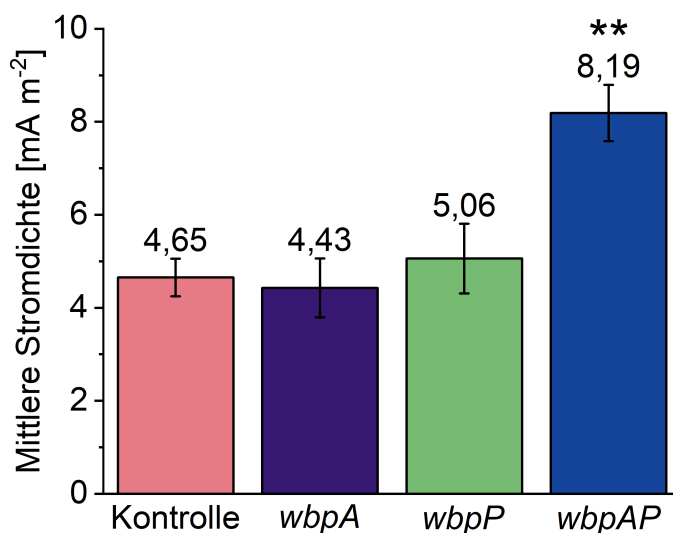


Abb. 20: Einfluss der Überexpression von *wbpA*, *wbpP* sowie der Co-Überexpression beider Gene auf die mittlere Stromdichte in mikrofluidischen MEZ. Die chronoamperometrische Untersuchung erfolgte unter Anlegen einer Spannung von 0 V *vs.* SHE für 48 h. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von unabhängigen Replikaten dar (n = 3). Die Sternchen zeigen signifikante Unterschiede zum Kontrollstamm mit dem leeren Plasmid an (ungepaarter t-Test: ** = p < 0,01). Kontrolle = JG1475, *wbpA* = JG1862, *wbpP* = JG1862 und *wbpAP* = JG1863.

untersten Bereich der Messempfindlichkeit des OCT-Geräts lag ($8 \times 8 \times 5,5 \mu\text{m}$).

3.2.3 Systematische Untersuchung von BpfA, BpfG und AggA als Faktoren für die Biofilmbildung bei *Shewanella oneidensis*

Im Rahmen der WbpA- und WbpP-Experimente wurde untersucht, inwiefern die Expression von zwei Enzymen, die die Zuckerchemie der EZM verändern, die Eigenschaften eines Biofilms beeinflussen kann und ob dessen Leistungsfähigkeit in einem BES verbessert werden kann. Diese Untersuchungen warfen die Frage auf, wie andere Mechanismen, die bereits mit der Biofilmbildung in Verbindung gebracht wurden, die Biofilmentwicklung und -architektur unter verschiedenen Bedingungen beeinflussen. BpfA, BpfG und AggA sind Teil eines extrazellulären Proteinnetzwerks und konnten bereits in Verbindung mit Biofilmbildung gebracht werden (Zhou *et al.*, 2015; De Windt *et al.*, 2006; Theunissen *et al.*, 2009; De Vriendt *et al.*, 2005). Bisherige Untersuchungen sind jedoch ausschließlich unter oxischen Bedingungen durchgeführt worden und es stellt sich die Frage, inwiefern diese Proteine die Biofilmbildung in *S. oneidensis* unter anoxischen sowie Elektroden-atmenden Bedingungen beeinflussen. Sowohl BpfA als auch AggA sind Agglutinationsproteine, die bei erhöhtem Vorkommen zu einer Biofilmzunahme führen (Zhou *et al.*, 2015; De Vriendt *et al.*, 2005), weshalb der Einfluss der überexprimierten Gene untersucht wurde. *aggA* wurde mit Hilfe eines durch Arabinose induzierbaren Expressionsplasmids überexprimiert und als Kontrolle wurde ein Stamm mit einem leeren Plasmid untersucht. Die Überexpression von *bpfA* konnte hingegen nicht mit einem Expressionsplasmid erreicht werden, da das 8.307 bp große Gen eine hohe Anzahl von Sequenzwiederholungen enthält. Der native Promotor wurde daher durch den Promotor von *cymA* ersetzt. *CymA* wurde ausgewählt, da es sich um ein *c*-Typ-Cytochrom handelt, das für die anaerobe Atmung

in *S. oneidensis* unerlässlich ist, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass es unter anoxischen Bedingungen stark transkriptionsinduziert ist. Als Kontrolle wurde der Wirtstamm *S. oneidensis* MR-1 $\Delta\lambda$ verwendet. BpfG ist ein bifunktionelles Protein, das sowohl für die Sekretion als auch für die anschließende Spaltung von BpfA erforderlich ist. Daher haben sowohl ein Mangel als auch eine Überexpression von *bpfG* negative Auswirkungen auf die Biofilmbildung. Zhou *et al.* (2015) konnten jedoch zeigen, dass eine Punktmutation (C116S) im katalytischen Zentrum des Proteaseteils zu einer Überproduktion von Biofilm führt. Daher wurde neben der Überexpression von BpfA und AggA auch die C116S-Mutation von BfG als weitere potentiell Biofilmverändernde Komponente untersucht. Die Ergebnisse der genomisch untersuchten Gene (*bpfA* und *bpfG*) sind im Folgenden getrennt vom Plasmid-basierten Gen (*aggA*) dargestellt.

3.2.3.1 Einfluss von BpfA, BpfG und AggA auf die Biofilmentwicklung unter oxischen Bedingungen

Zunächst wurde die Biofilmentwicklung unter oxischen Bedingungen untersucht. In Abb. 21 sind die Biofilme als farbcodierte Höhenkarten gezeigt. In dieser Draufsicht ist erkennbar, dass sich die Biofilmarchitektur der untersuchten Stämme kaum von den Kontrollstämmen unterscheidet. Alle Stämme zeigten eine relativ lange Latenzphase von fast zwei Tagen. Anschließend wuchsen alle Biofilme recht gleichmäßig, ohne dass sich turmartige Strukturen bildeten. Beide Kontrollstämmen konnten 142 h lang robust kultiviert werden. Die Kontrolle mit dem leeren Plasmid (JG1475) war hierbei jedoch stabiler als die Kontrolle ohne Plasmid (JG918), da zwei von drei JG918-Fließzellen bereits nach 96 h erste Anzeichen einer Biofilmbilösung zeigten. Dennoch führte diese teilweise Ablösung nicht zu einer vollständigen Auswaschung

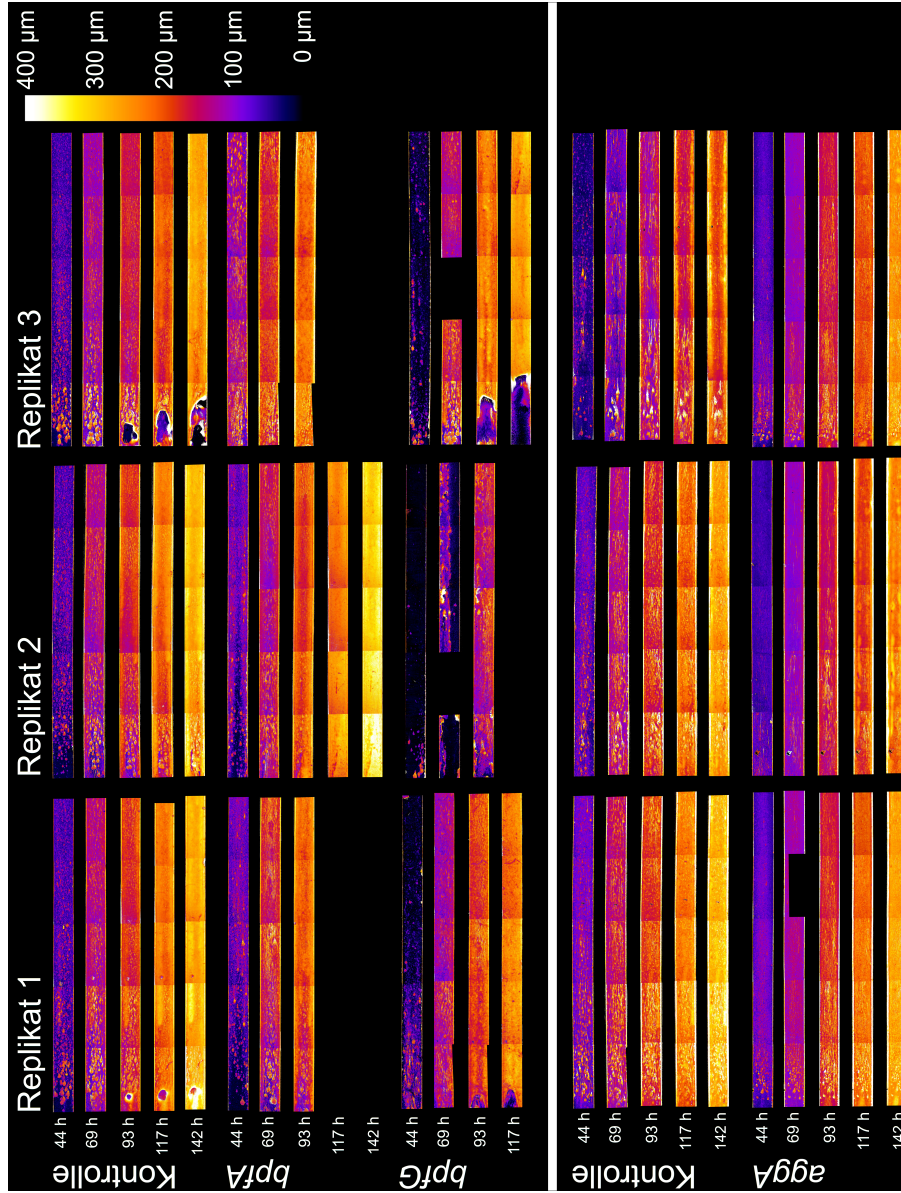


Abb. 21: Qualitative Analyse des Einflusses von BpfA, BpfG und AggA auf die Biofilmbildung von *S. oneidensis* unter oxidischen Bedingungen mit Laktat als Elektronendonator. Von jedem Kultivierungskanal wurden fünf Bilder aufgenommen, durch Bearbeitung in farbcodierte Höhenkarten umgewandelt und durch Stitching zu einem Bild kombiniert. Die abgebildeten Kultivierungskanäle haben eine Größe von 3 x 45 mm und entsprechen einer Draufsicht auf den Biofilm, mit der Fließrichtung von links nach rechts. Stämme von oben nach unten: JG918, JG1739, JG1738, JG1475 und JG1758.

des Biofilms. Die Biofilme der *bpfA*- und *bpfG*-Mutanten hingegen schienen weniger stabil gewachsen zu sein. Der *bpfA*-Biofilm wurde in zwei von drei Fließzellen nach 93 h ausgeschwemmt und nur eine Probe konnte über die gesamte Versuchsdauer kultiviert werden. Der gesamte Biofilm der *bpfG*-Mutante wurde in einem Replikat nach 93 h und in den beiden anderen nach 117 h abgeschert. Die Ablösung begann stromaufwärts und in Replikat 3 konnte beobachtet werden, dass diese Ablösung schrittweise erfolgte.

Auch bei diesen Experimenten spiegelt sich der qualitative Eindruck in den quantitativen Daten in Abb. 22 und 23 wieder. Allerdings sollten für die genomischen Veränderungen (Abb. 22) nur die ersten drei Messpunkte betrachtet werden, da anschließend keine Triplikate mehr vorhanden waren und somit nach diesem Punkt keine statistisch relevanten Aussagen mehr getroffen werden können. Die *bpfG*-Mutante zeigte nach 44 h deutlich weniger Biofilm in Bezug auf das Biovolumen und die Biofilmhöhe, nach 69 und 93 h war die Entwicklung jedoch vergleichbar mit der Kontrolle. Im Gegensatz dazu zeigte die *bpfA*-Mutante nach 44 und 69 h eine ähnliche Menge an Biofilm wie die Kontrolle, aber nach 93 h waren das Biovolumen und die Biofilmhöhe leicht erhöht. Sowohl der *bpfA*- als auch der *bpfG*-Stamm zeigten in den ersten vier Tagen der Kultivierung eine mit dem Kontrollstamm vergleichbare Porosität. Anzumerken ist, dass die Standardabweichung der beiden Mutanten grundsätzlich höher war als die der Kontrollgruppe. Somit lässt sich feststellen, dass die beiden Mutationen unter den untersuchten Bedingungen offenbar zur Bildung etwas instabilerer Biofilme mit einer höheren Fehlerspanne führen. Die Überexpression von *aggA* führte zu keinem nachweisbaren Unterschied in der Biofilmhöhe im Vergleich zur Kontrolle mit dem leeren Plasmid. Überraschenderweise war jedoch das Biovolumen der Kontrolle nach 117 h im Vergleich zu der überexprimierenden *aggA*-Mutante erhöht. Nach 4 Tagen Kultivierung wies die *aggA*-überexprimierende Mutante eine Biofilmporosität von

16 - 21 % auf, die dann aber auf 0 % sank. Das leere Plasmid schien keinen Einfluss auf das Volumen und die Höhe des Biofilms im Vergleich zur genomischen Kontrolle gehabt zu haben, mit Ausnahme des Biovolumens am vierten Messpunkt. Vermutlich ist dies jedoch auf Messungenauigkeiten zurückzuführen, da beim nächsten Messpunkt keine Unterschiede mehr feststellbar waren (Abb. A8). Darüber hinaus waren alle Stämme bereits nach 44 h vollständig bedeckt, mit Ausnahme der *bpfG*-Mutante,

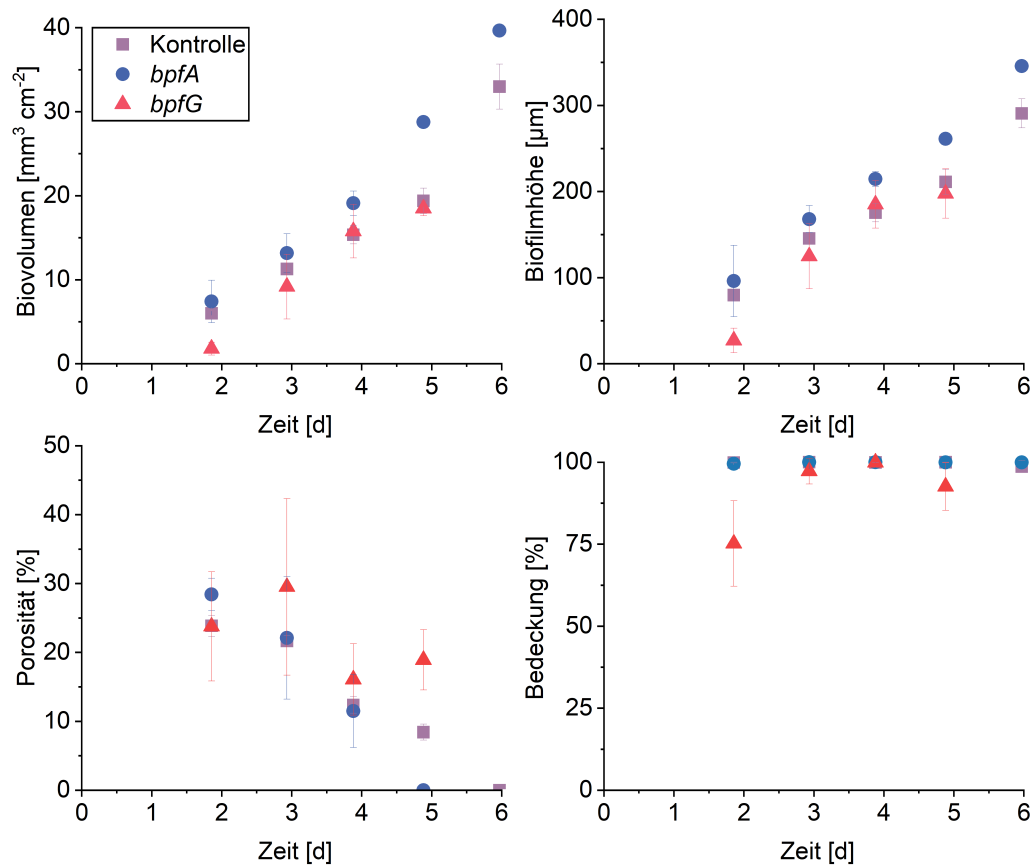


Abb. 22: Einfluss von *bpfG* (C116S) sowie der Überexpression von *bpfA* auf die Biofilmbildung von *S. oneidensis* unter oxischen Bedingungen. Die Biofilme wurden mit Laktat als Elektronendonator und atmosphärischem Sauerstoff als Elektronenakzeptor in mikrofluidischen Fließzellen kultiviert. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von unabhängigen Replikaten dar (n = 3). Kontrolle = JG918, *bpfA* = JG1739 und *bpfG* = JG1738. Es ist anzumerken, dass nach 117 Stunden nur noch eine Fließzelle von *bpfA* und zwei von *bpfG* und nach 142 Stunden nur noch eine Fließzelle von *bpfA* verblieben. Eine statistische Auswertung ist in Tab. A4-A6 zu finden.

welche erst nach 69 h eine vollständige Bedeckung zeigte. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass unter oxischen Bedingungen zwar punktuelle Unterschiede in der Biofilmentwicklung, aber keine auffälligen grundsätzlichen Unterschiede zu beobachten waren. Im nächsten Schritt wurden daher alle Stämme unter anoxischen Bedingungen untersucht, um zu prüfen, ob es weiterhin keine wesentlichen qualitativen oder quantitativen Unterschiede in der Biofilmentwicklung gibt.

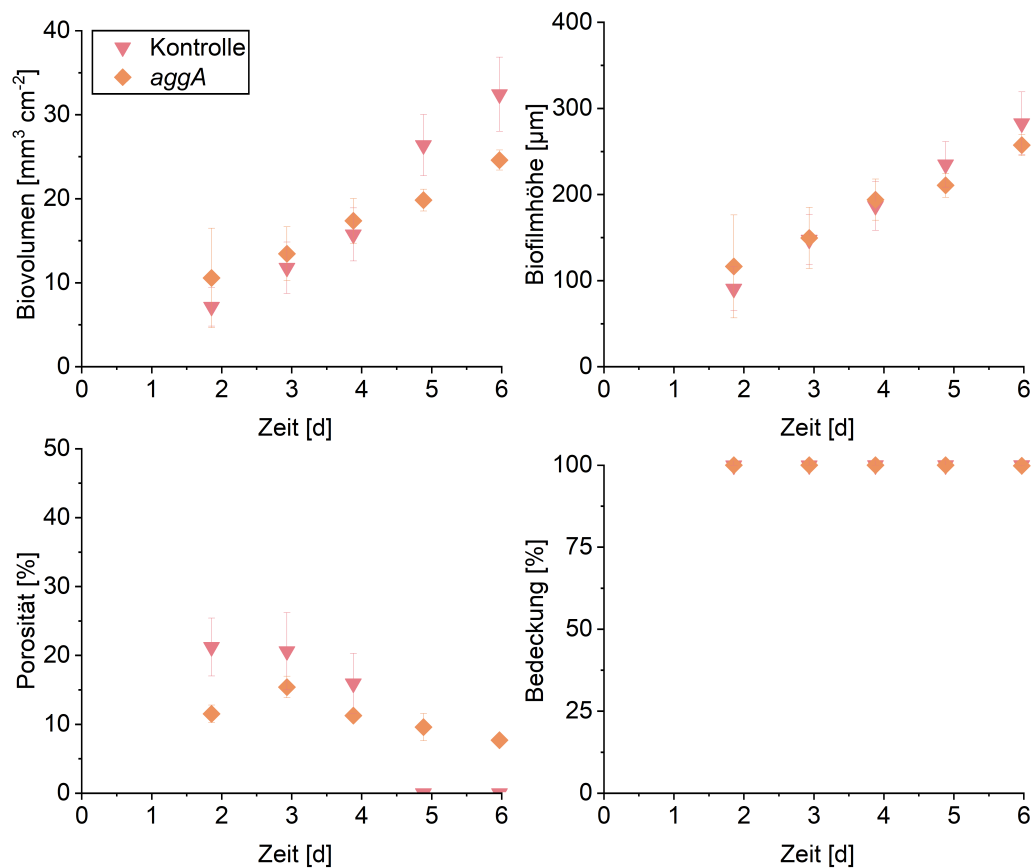


Abb. 23: **Einfluss der *aggA*-Überexpression auf die Biofilmbildung von *S. oneidensis* unter oxischen Bedingungen.** Die Biofilme wurden mit Laktat als Elektronendonator und atmosphärischem Sauerstoff als Elektronenakzeptor in mikrofluidischen Fließzellen kultiviert. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von unabhängigen Replikaten dar ($n = 3$). Kontrolle = JG1475 und *aggA* = JG1758. Eine statistische Auswertung ist in Tab. A4-A6 zu finden.

3.2.3.2 Einfluss von BpfA, BpfG und AggA auf die Biofilmentwicklung unter anoxischen Bedingungen

Die anoxische Biofilmentwicklung wurde mit Laktat als Elektronendonator und Fumarat als Elektronenakzeptor untersucht, wobei die sonstigen Versuchsbedingungen unverändert blieben. Die ersten OCT-Daten konnten bereits nach 20 h aufgenommen werden und die Gesamtwachstumsrate war im Vergleich zur Kultivierung mit Sauerstoff als terminalem Elektronenakzeptor deutlich schneller. Aus den Höhenkarten der anoxischen Biofilme in Abb. 24 ist sofort ersichtlich, dass die Biofilmarchitektur der *bpfA*- und *bpfG*-Mutanten nicht mit der des Kontrollstammes vergleichbar ist. Der Kontrollstamm wies ein überwiegend einheitliches Wachstumsverhalten auf, wobei der Biofilm aus zahlreichen kleinen Kolonien bestand. Die *bpfA*- und *bpfG*-Mutantenstämme hingegen waren zu den ersten beiden Messzeitpunkten nur geringfügig besiedelt, mit verstreuten, etwa 50 μm hohen Kolonien auf einem gleichmäßigen Biofilmrasen von etwa 20 μm Höhe. Anschließend wuchsen die Biofilme mit deutlich erhöhter Geschwindigkeit. Beide Mutanten bildeten breite Türme mit einer Höhe von über 200 μm . Allerdings schienen die Türme der *bpfA*-Mutante etwas breiter zu sein als die der *bpfG*-Mutante. Erwähnenswert ist außerdem, dass allein die Zugabe des leeren Plasmids zu einem deutlichen Unterschied in der Biofilmarchitektur führte (Abb. A9). Die Kontrolle mit dem leeren Plasmid bildete weniger Kolonien, die größere turmartige Strukturen zu bilden schienen. Die *aggA*-überexprimierende Mutante schien ebenfalls Biofilme zu bilden, die aus kleineren Kolonien bestehen, was zu einer gleichmäßigeren Bedeckung im Vergleich zur Kontrolle führte.

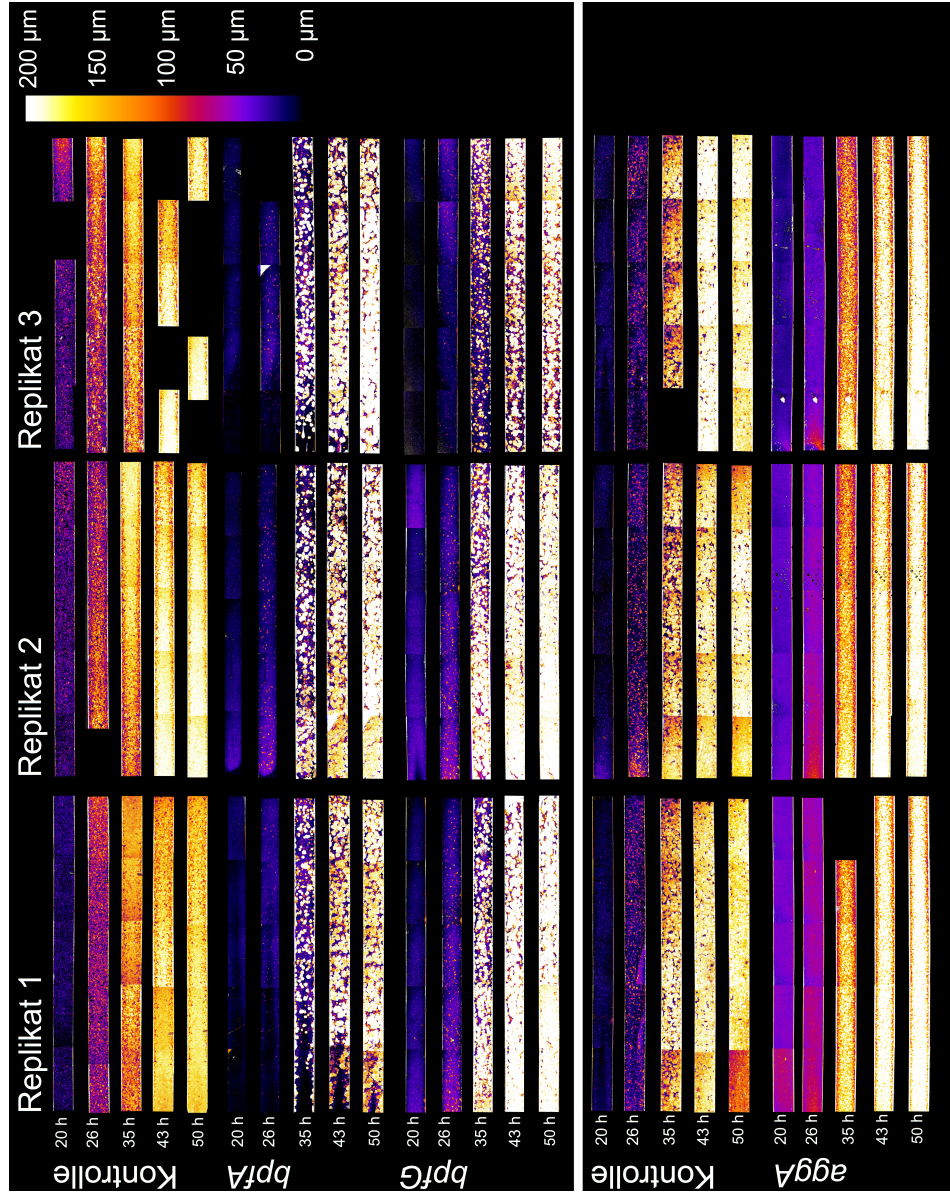


Abb. 24: Qualitative Analyse des Einflusses von BpfA, BpfG und AggA auf die Biofilmbildung von *S. oneidensis* unter anoxischen Bedingungen mit Fumarat als Elektronenakzeptor. Von jedem Kultivierungskanal wurden fünf Bilder aufgenommen, diese durch Bearbeitung in farbcodierte Höhenkarten umgewandelt und durch Stitching zu einem Bild kombiniert. Die abgebildeten Kultivierungskanäle haben eine Größe von 3 x 45 mm und entsprechen einer Draufsicht auf den Biofilm, mit der Fließrichtung von links nach rechts. Stämme von oben nach unten: JG918, JG1739, JG1738, JG1475 und JG1758.

Diese Eindrücke werden von den Daten in Abb. 25 und 26 bestätigt. Hinsichtlich des Biovolumens und der Biofilmhöhe zeigte nur die *bpfG*-Mutante eine Zunahme im Vergleich zum Kontrollstamm. Das Biovolumen der *bpfA*-Mutante war nach 35 h im Vergleich zum Kontrollstamm sogar deutlich geringer. Für die *aggA*-überexprimierende Mutante konnten in Bezug auf das Biovolumen und die Biofilmhöhe keine grundsätzlichen Unterschiede zur Kontrolle festgestellt werden, die über punktuelle Abweichungen hinausgehen. Die vollständige Bedeckung war bei allen Stämmen spätestens nach

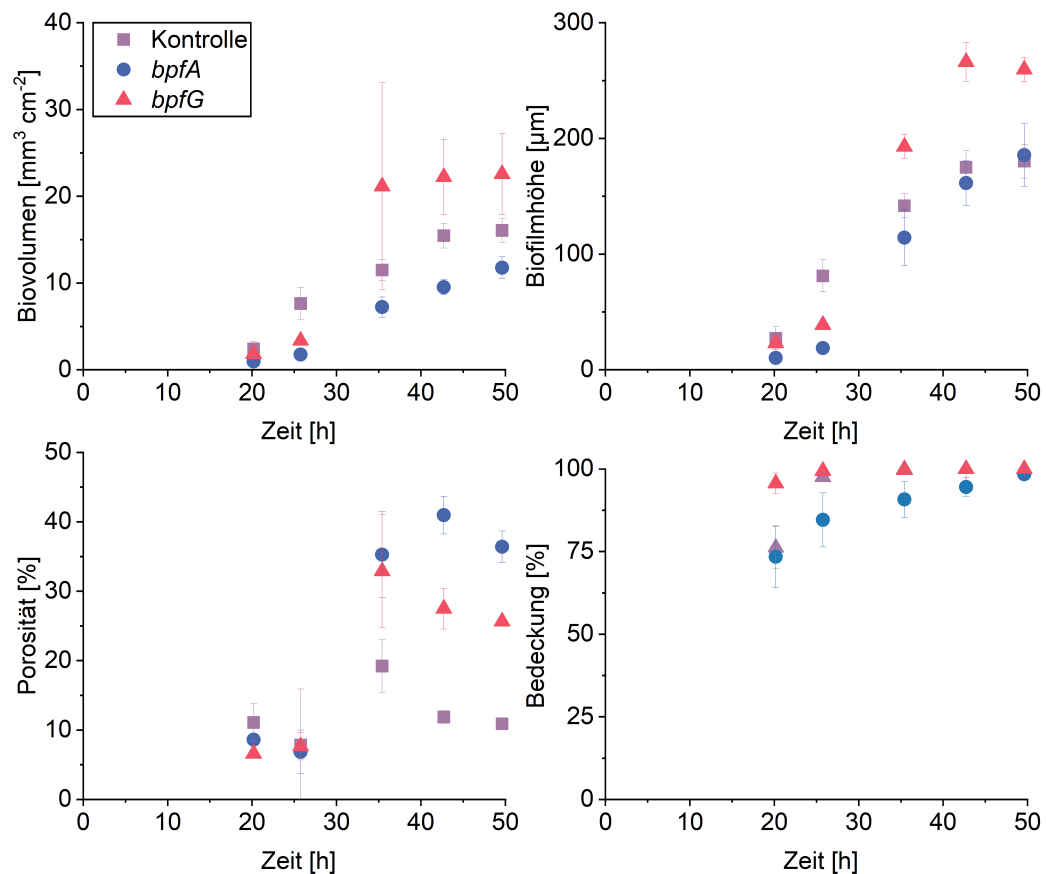


Abb. 25: Einfluss von *bpfG* (C116S) sowie der Überexpression von *bpfA* auf die Biofilmbildung von *S. oneidensis* unter anoxischen Bedingungen. Die Biofilme wurden mit Laktat als Elektronendonator und Fumarat als Elektronenakzeptor in mikrofluidischen Fließzellen kultiviert. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von unabhängigen Replikaten dar (n = 3). Kontrolle = JG918, *bpfA* = JG1739 und *bpfG* = JG1738. Eine statistische Auswertung ist in Tab. A7-A9 zu finden.

35 h erreicht, mit Ausnahme des *bpfA*-Stammes, welcher 50 h benötigte. Bezüglich der Biofilmporosität schien die Überexpression von *aggA* zu signifikant dichteren Biofilmen zu führen. Die *bpfA*- und *bpfG*-Mutanten hingegen bildeten signifikant porösere Biofilme als die Kontrolle, wobei der *bpfA*-überexprimierende Stamm wiederum signifikant poröser als die *bpfG*-Mutante war. Obwohl qualitative Unterschiede zwischen den beiden Kontrollstämmen feststellbar waren, gab es keine konsistenten Unterschiede in Bezug auf Biovolumen, Biofilmhöhe oder Bedeckung (Abb. A9). Die

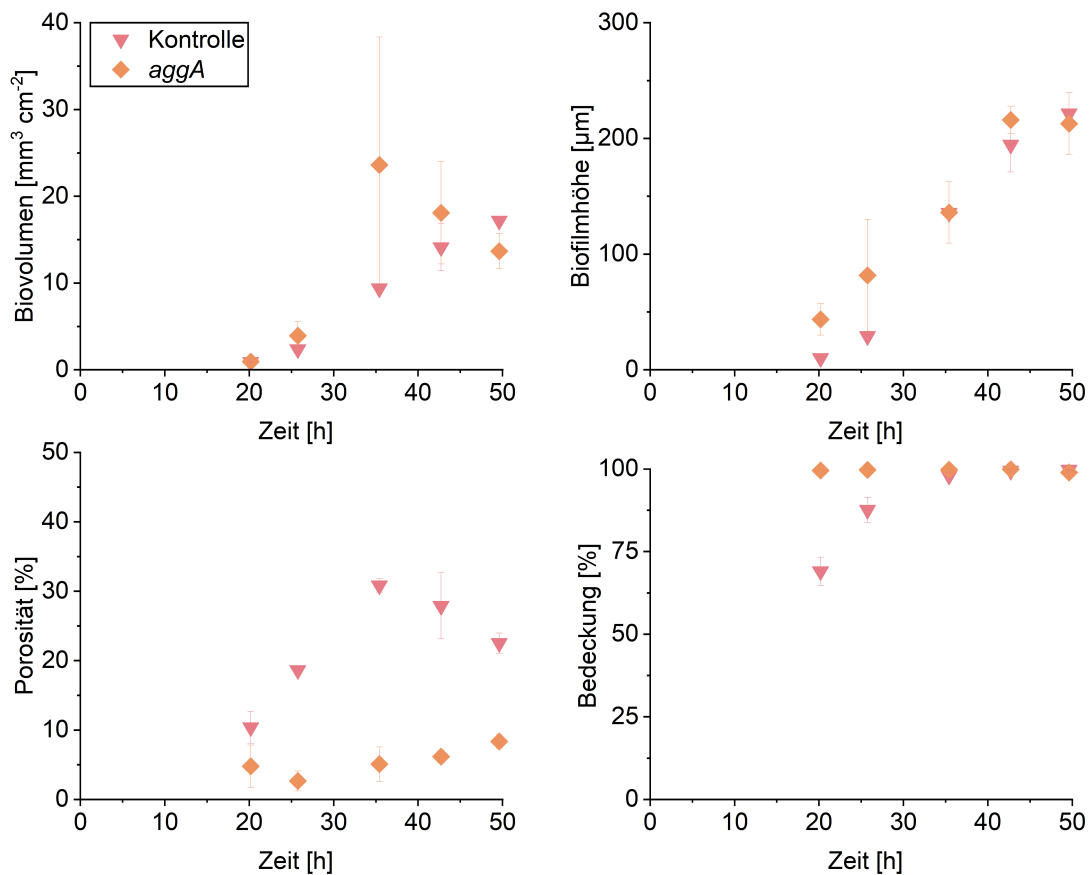


Abb. 26: **Einfluss der *aggA*-Überexpression auf die Biofilmbildung von *S. oneidensis* unter anoxischen Bedingungen.** Die Biofilme wurden mit Laktat als Elektronendonator und Fumarat als Elektronenakzeptor in mikrofluidischen Fließzellen kultiviert. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von unabhängigen Replikaten dar (n = 3). Kontrolle = JG1475 und *aggA* = JG1758. Eine statistische Auswertung ist in Tab. A7-A9 zu finden.

Expression des leeren Plasmids schien lediglich zu poröseren Biofilmen zu führen. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass im Vergleich zu den oxischen Versuchen unter anoxischen Bedingungen mit Fumarat als Elektronenakzeptor deutliche qualitative sowie auch quantitative Unterschiede in der Biofilmentwicklung nachgewiesen werden konnten. Um zu überprüfen inwiefern diese Veränderungen in der Biofilmarchitektur sich auf die Zell-Zell-Elektronenübertragung auswirken, wurde die Stromproduktion aller Stämme in MEZ untersucht.

3.2.3.3 Einfluss von BpfA, BpfG und AggA auf die Stromproduktion

Der Einfluss der drei Mutationen auf die Stromproduktion wurde mit mikrofluidischen bioelektrochemischen Durchflusszellen untersucht. Wie in Abb. 27 gezeigt, hatten nur die Mutationen *bpfA* und *bpfG* einen positiven Effekt auf die mittlere Stromdichte und

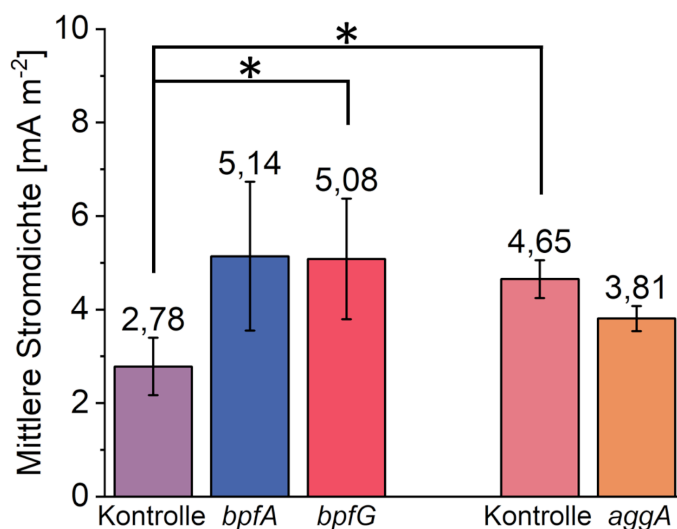


Abb. 27: Einfluss von *bpfG* (C116S) sowie der Überexpression von *bpfA* und *aggA* auf die mittlere Stromdichte in mikrofluidischen bioelektrochemischen Reaktoren. Die chronoamperometrische Untersuchung erfolgte unter Anlegen einer Spannung von 0 V vs. SHE für 48 h. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von unabhängigen Versuchen dar (n = 3). Sternchen stellen signifikante Unterschiede zum violetten Kontrollstamm dar (ungepaarter t-Test: * = p < 0,05). Kontrollstamm für *bpfA* und *bpfG* = JG918, *bpfA* = JG1739, *bpfG* = JG1738, Kontrollstamm für *aggA* = JG1475 und *aggA* = JG1758.

fürten jeweils zu einem 1,8-fachen Anstieg, wobei nur der Wert der *bpfG*-Mutation signifikant war. Die Überexpression von *aggA* führte hingegen zu einem 0,82-fachen Rückgang der mittleren Stromdichte. Erwähnenswert ist außerdem, dass sich allein die Anwesenheit des leeren Plasmids positiv auf die Stromdichte auswirkte, mit einem signifikanten Anstieg um das 1,7-fache. Biofilmdaten konnten unter Anoden-atmenden Bedingungen, wie bereits erwähnt, aufgrund der ungenügenden Messsensitivität des OCTs nicht generiert werden.

4 Diskussion

Mikrobielle elektrochemische Systeme (MES) stellen eine vielseitige Plattformtechnologie mit außerordentlichem Potential für den Schritt zu einer nachhaltigen Bioökonomie dar. Allerdings sind diese Systeme aufgrund ihrer zu geringen Energieausbeuten derzeit nicht wettbewerbsfähig mit konventionellen Systemen. Verbesserungen sind sowohl auf technische als auch auf biologische Aspekte ausgerichtet. Hierbei nimmt insbesondere die Bakterien-Elektroden-Schnittstelle eine Schlüsselstelle ein. Bakterien sind der Katalysator in MES und wachsen hauptsächlich in Form eines Biofilms auf der Elektrode. Häufig werden die Elektrode und der Biofilm sogar als Komposit angesehen. Ziel dieser Arbeit war es zunächst, die Biofilmentwicklung einer mikrobiellen elektroaktiven Modellgemeinschaft aus *S. oneidensis* und *G. sulfurreducens* aufzuklären. Da mit *Geobacter*-Spezies bis heute die höchsten nachweisbaren Stromausbeuten erzielt werden, sollten diese Untersuchungen zudem einen Maßstab liefern, welche Stromausbeuten unter natürlichen Bedingungen erreicht werden können.

4.1 Aufklärung der Entwicklung von kooperativen

Anoden-Biofilm-Strukturen

Um in der Lage zu sein, eine artenübergreifende Entwicklung anodischer Biofilme zu untersuchen, wurde ein System benötigt, welches eine Korrelation von Biofilmentwicklung und Stromproduktion ermöglicht. Aus diesem Grund wurde zunächst eine mikrofluidische Kultivierungsplattform mit integrierter automatisierter dreidimensionaler Bildgebung etabliert, deren Kernelement kontinuierlich durchströmbare Reaktoren darstellen. Mit Hilfe dieser Plattform ist es möglich, eine Vielzahl

an Experimenten parallel mit stark reduzierter aktiver Arbeitszeit reproduzierbar durchführen zu können. Die Modularität ermöglicht hierbei das Anlegen präziser Kultivierungsbedingungen, um z. B. die natürlichen Umweltbedingungen so genau wie möglich nachzuahmen.

4.1.1 Eine *S. oneidensis* / *G. sulfurreducens*-Cokultur verhält sich anders, als von Einzelkulturversuchen zu erwarten wäre

Als Modellgemeinschaft wurden die beiden Modellorganismen *S. oneidensis* und *G. sulfurreducens* ausgewählt und sowohl als Einzelkulturbiofilme sowie als Cokultur-Biofilm mittels mikrofluidischer MEZ untersucht. Die Ergebnisse der Einzelkulturversuche stehen im Einklang mit bereits veröffentlichter Literatur. *S. oneidensis* ist ein schlechter anodischer Biofilmbildner und daher grundsätzlich stark auf vermittelten Elektronentransfer angewiesen (Kitayama *et al.*, 2017; Marsili *et al.*, 2008). In einem Durchflusssystem kann vermittelter Elektronentransfer jedoch nicht oder zumindest nur wenig zur Energieproduktion beitragen, da Shuttle-Moleküle wie Riboflavin ständig ausgewaschen werden. Diese Auswaschung stellt demnach eine zusätzliche metabolische Belastung für den Organismus dar (Engel *et al.*, 2019). *G. sulfurreducens* produzierte nach 72 h die 1.333-fache Stromdichte im Vergleich zu *S. oneidensis* bei einer durchschnittlichen Biofilmdicke von mehr als 30 μm . Darüber hinaus benötigte der Biofilm von *G. sulfurreducens* mehr Zeit, um ein Stromdichteplateau zu erreichen, was durch eine langsamere Teilungsrate und die Entwicklung komplexerer Biofilmstrukturen erklärbar ist (Reguera *et al.*, 2006; Marsili *et al.*, 2010; Koch und Harnisch, 2016; Otero *et al.*, 2021).

Die Inokulation von *S. oneidensis* und *G. sulfurreducens* mit Laktat als einziger

Kohlenstoff- und Elektronenquelle führte zu bemerkenswerten Unterschieden im Vergleich zu den Einzelkulturversuchen. Da für *S. oneidensis* keine Biofilmdaten generiert werden konnten, kann das Verhalten der Cokultur jedoch nur mit den *G. sulfurreducens*-Biofilmdaten verglichen werden. Während bei *G. sulfurreducens* bereits vor dem starken Anstieg der Stromdichte ein beträchtliches Biofilmwachstum beobachtet wurde, blieb die Cokultur in Bezug auf das Biofilmwachstum hinter der Entwicklung der Stromdichte zurück. Die Spitze der Stromentwicklung (erste Ableitung der Stromdichte) in *G. sulfurreducens* an Tag 2 korreliert mit der Wachstumsrate des Biofilms, was darauf hindeutet, dass die Stromproduktion zu diesem Zeitpunkt in erster Linie von der Zellzahl abhängig zu sein scheint und dass danach andere Faktoren die Elektroaktivität begrenzen. Diese Begrenzung könnte beispielsweise auf die Bildung eines vertikalen Protonengradienten von der äußeren Biofilmschicht zur Anodenoberfläche zurückzuführen sein (Torres *et al.*, 2008). Wird die Stromdichte gegen das Biovolumen aufgetragen (siehe Abb. 28), ist dieses biphasische Verhalten deutlicher zu erkennen. Die Steigung zwischen den ersten beiden Datenpunkten ist deutlich niedriger als die Steigung zwischen den letzten beiden Datenpunkten. Die Tatsache, dass das Biovolumen von *G. sulfurreducens* im zweiten Stadium der Entwicklung nahezu stagniert, die Stromdichte aber weiterhin ansteigt, deutet darauf hin, dass *G. sulfurreducens* seine Biofilmstruktur weiter optimieren kann. Es liegt die Vermutung nahe, dass *G. sulfurreducens* zunächst primär in die Höhe wächst und im Anschluss der Biofilm durch den Einbau leitfähiger Komponenten weiter optimiert wird. Die Cokultur zeigte keine vergleichbare exponentielle Stromentwicklung, was möglicherweise auf eine Limitierung durch die Laktatumsbildungsrate von *S. oneidensis* zurückzuführen ist, was dann zu dem eher linearen Wachstumsverhalten geführt haben könnte. Es scheint auch möglich, dass das späte Biofilmwachstum in der Cokultur, das nicht mit der langsamen Entwicklung der Stromdichte korrespondiert, auf das Wachstum des Biofilms auf oder innerhalb

inaktiver Zellbereiche zurückzuführen ist, die nicht der direkten Zellyse unterliegen.

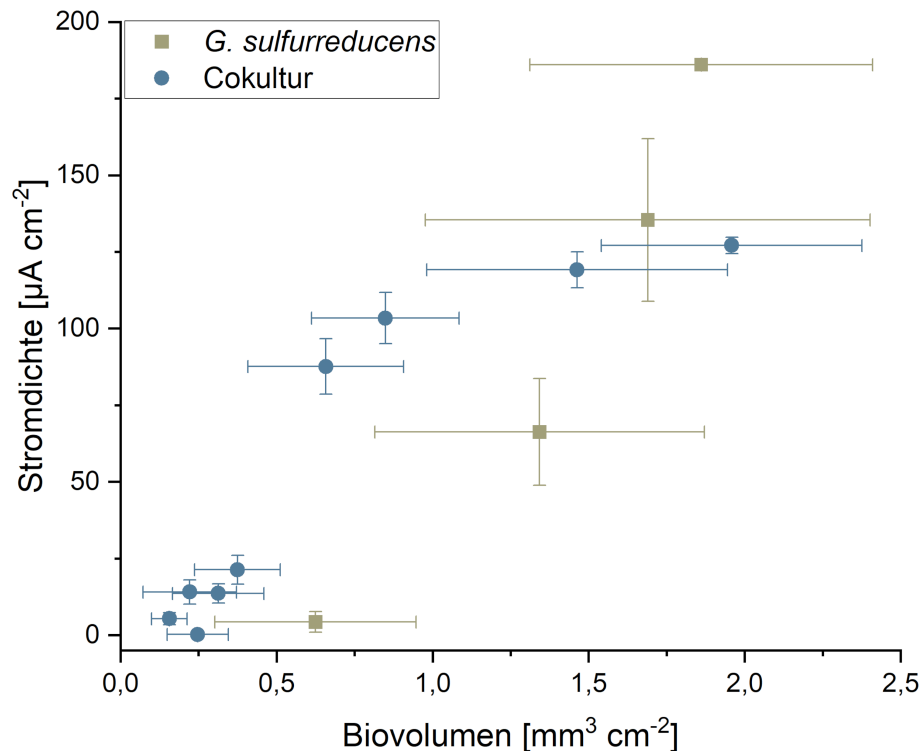


Abb. 28: **Stromdichte gegen das Biovolumen einer *G. sulfurreducens*- und einer *S. oneidensis* / *G. sulfurreducens*-Cokultur im Vergleich.** Die dargestellten Daten sind ebenfalls in einer anderen Form in Abb. 12-13 dargestellt.

Während die Porosität des Biofilms von *G. sulfurreducens* während des gesamten Experiments etwa 36 - 40 % betrug, nahm sie in der Cokultur von etwa 21 ± 18 % zu Beginn auf $6,5 \pm 5,5$ % am Ende des Experiments ab. Es ist möglich, dass eine bessere Versorgung mit Elektronendonator und Kohlenstoff zu poröseren Biofilmen in *G. sulfurreducens*-Einzelkulturen führte. Da die *G. sulfurreducens*-Kulturen im Einzelkulturversuch über das Medium mit einem Überschuss an Acetat versorgt wurden, sind sie vermutlich aufgrund der verbesserten Substratverfügbarkeit bei gleichzeitig reduziertem pH-Gradienten tendenziell höher und poröser gewachsen. Die Biofilme der *S. oneidensis* / *G. sulfurreducens*-Cokultur hingegen wurden nur mit Laktat versorgt. Dies erforderte die Anwesenheit von *S. oneidensis* in der Cokultur, um eine Kreuzfütterung (engl.: *cross-feeding*) zu etablieren, bei der Laktat in Acetat

umgewandelt wird, das wiederum für *G. sulfurreducens* zugänglich ist. Laktat war zwar reichlich im Reaktor vorhanden, aber Acetat wurde nur in unmittelbarer Nähe von *S. oneidensis* produziert, was *G. sulfurreducens* zwingt, in unmittelbarer Nähe von *S. oneidensis* zu wachsen. Dieses Verhalten spiegelt sich in der Stromproduktion, der Höhe des Biofilms, der Porosität und der Elektroaktivität wider und zeigt die Abhängigkeit von *G. sulfurreducens* gegenüber *S. oneidensis* in Bezug auf die Acetatversorgung und deren Folgen für die Biofilmbildung und die Stromproduktion. Während *S. oneidensis* für Cokulturen in bioelektrochemischen Batch-Experimenten aufgrund der Riboflavin-Produktion vorteilhaft sein könnte, wird dieser Faktor durch ständige Verdünnung mit neuem Medium minimiert. Es ist davon auszugehen, dass dies der Grund für die verringerte Stromproduktion der Cokultur im Vergleich zu *G. sulfurreducens* allein ist.

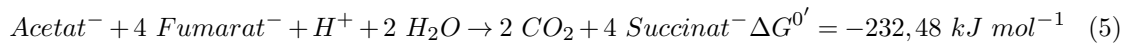
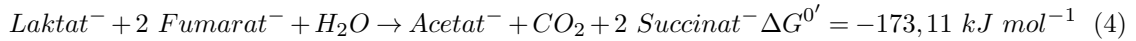
4.1.2 Das Verteilungsmuster von *S. oneidensis* und *G. sulfurreducens* im Cokultur-Biofilm deutet auf einen direkten Interspezies-Elektronentransfer hin

Um die räumliche Verteilung der *S. oneidensis*- und *G. sulfurreducens*-Zellen aufzuklären, wurde ein Cokultur-Biofilm mittels FISH-Analyse untersucht. Hierbei konnte ein dreidimensionales *G. sulfurreducens*-Netzwerk sichtbar gemacht werden, in das tubuläre *S. oneidensis*-Kolonien mit einem Durchmesser von $\approx 5 \mu\text{m}$ und einer Höhe von $\approx 10 \mu\text{m}$ eingebettet waren. Die Tubuli waren jeweils etwa $2,5 \mu\text{m}$ voneinander entfernt und bildeten sich orthogonal zur Anode und standen nicht in direktem Kontakt mit ihr. Diese Daten bestätigen die oben aufgestellte Hypothese, dass *G. sulfurreducens* in unmittelbarer Nähe zu *S. oneidensis* bleiben muss, damit die Acetatversorgung so effizient wie möglich ist. Jeder *S. oneidensis*-Tubulus war

direkt von *G. sulfurreducens*-Zellen umgeben und teilweise durchdrungen, was darauf hindeutet, dass diese *Geobacter*-Zellen, die durch Nanowire verbunden sind, ein leitfähiges Netzwerk bilden. Zu einem gewissen Grad können auch Aussagen über die Vitalität getroffen werden, da das FISH-Signal mit dem Vorkommen an Ribosomen korreliert. Tatsächlich waren die aktivsten *G. sulfurreducens*-Zellen direkt neben den *S. oneidensis*-Tubuli lokalisiert. Da die Tubuli nicht in direktem Kontakt mit der Anodenoberfläche standen und der vermittelte Elektronentransfer in Durchflusssystemen vermutlich nur eine untergeordnete Rolle spielt, muss *S. oneidensis* demnach für den Elektronentransport auf das leitfähige Netzwerk von *G. sulfurreducens* zurückgreifen. Dies deutet auf einen direkten Interspezies-Elektronentransfer (DIET, *direct interspecies electron transfer*) von *S. oneidensis* zu *G. sulfurreducens* hin, was nach meinem Kenntnisstand bisher noch nicht nachgewiesen werden konnte. Es konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass für einen DIET leitfähige Pili keine grundsätzliche Voraussetzung darstellen (Liu *et al.*, 2018). Somit handelt es sich um eine wechselseitige Co-Abhängigkeit, in der *G. sulfurreducens* auf die Laktatversorgung durch *S. oneidensis* angewiesen ist und *S. oneidensis* seinerseits für den EET zur Anode auf *G. sulfurreducens* angewiesen ist.

Darüber hinaus wurde das Verhältnis der beiden Bakterienarten bestimmt und ergab ein Verhältnis von $33 \pm 10,7$ % *S. oneidensis*- zu 67 ± 10 % *G. sulfurreducens*-Zellen. Da diese Daten durch Pixelzählung innerhalb der binarisierten CLSM-Bilder gewonnen wurden, könnte die tatsächliche Anzahl der *G. sulfurreducens*-Zellen aufgrund ihrer geringeren Zellgröße, d. h. weniger Pixel pro Zelle, noch höher sein. Betrachtet man die theoretische Energieausbeute der beiden Organismen, so erscheint dies kontraintuitiv. *S. oneidensis* verbraucht Laktat und produziert Acetat und Kohlenstoffdioxid. *G. sulfurreducens* oxidiert Acetat vollständig zu Kohlenstoffdioxid. Der Einfachheit halber scheint es sinnvoll, den Energiegewinn der beiden Organismen

mit dem anaeroben Elektronenakzeptor Fumarat zu vergleichen, der mit +33 mV tatsächlich ein ähnliches Redoxpotential wie die hier verwendete Anode hat:



Geht man von einem notwendigen Energiebedarf von 80 kJ/mol ATP unter reversiblen zellulären Bedingungen aus, würde *G. sulfurreducens* 2,9 und *S. oneidensis* 2,2 ATP gewinnen. Theoretisch könnten also beide Organismen in nahezu identischen Mengen vorkommen. *S. oneidensis* ist jedoch nicht in der Lage, unter anoxischen Bedingungen durch oxidative Phosphorylierung mit Laktat als Kohlenstoffquelle zu wachsen (Pinchuk *et al.*, 2011; Meshulam-Simon *et al.*, 2007), und das eine ATP-Molekül pro verbrauchtem Laktat, das durch Substratstufenphosphorylierung aus der Umwandlung von Acetyl-CoA in Acetat gewonnen wird, scheint am wichtigsten zu sein (Klein *et al.*, 2024). Mit anderen Worten, der Energieanteil, der durch oxidative Phosphorylierung gewonnen werden könnte, wird aus einem (unbekannten) metabolischen Grund nicht effizient für die ATP-Produktion genutzt. In diesem Fall würde sich das beobachtete Verhältnis von 1:3 tatsächlich im ATP-Gewinn der beiden Organismen widerspiegeln. Um die Gesamtzahl der beteiligten Spezies zu bestimmen, könnten für zukünftige Experimente Analysen mittels quantitativer Echtzeit-PCR (*real-time quantitative PCR*, qPCR) in Betracht gezogen werden.

Trägt man das Verhältnis von *S. oneidensis* zu *G. sulfurreducens* gegen die Biofilmtiefe auf, so ist zu erkennen, dass in den oberen Biofilmschichten (0 bis -5 µm) die Häufigkeit beider Organismen gleich verteilt ist. Mit zunehmender Nähe zur Anode verschiebt

sich dieses Gleichgewicht zugunsten von *G. sulfurreducens*, bis in einer Tiefe von -25 μm etwa $87,5 \pm 15 \%$ der vorhandenen Organismen *G. sulfurreducens* sind. Dies deutet darauf hin, dass die letzten Stadien des Elektronentransfers fast vollständig mit Hilfe der *G. sulfurreducens*-Maschinerie durchgeführt werden.

4.1.3 Die Aktivität ist im Zentrum des Biofilms am höchsten

Die Ergebnisse der FISH-Analyse geben Auskunft über das ortsaufgelöste Vorkommen der beiden Bakterienarten und zu einem gewissen Grad können ebenfalls Aussagen über die Vitalität getroffen werden. Um quantitative Aussagen über die Vitalität der Mikroorganismen in verschiedenen Schichten des Biofilms treffen zu können, wurde eine Lebend-Tot-Färbung eines Cokultur-Biofilms durchgeführt. Die Ergebnisse der anschließenden Fluoreszenzmikroskopie zeigen, dass die Aktivität im Zentrum des Biofilms am höchsten war. Während die äußerste Schicht des Biofilms fast ausschließlich aus toten Zellen bestand, zeigten die Biofilmschichten nahe der Anodenoberfläche eine Lebensfähigkeit von etwa 50 %. Durch eine Dispersion konnte ein Querschnitt über den gesamten Biofilm erstellt werden. Hierzu wurde der Biofilm mit PBS-Lösung und einer Pipette von einer Anode abgespült und anschließend untersucht, wobei eine Lebensfähigkeit von $82 \pm 12 \%$ festgestellt werden konnte. Wenn man bedenkt, dass die äußerste und die innerste Schicht eine Lebensfähigkeit von $2 \pm 0,5 \%$ bzw. 50 % aufweisen, bedeutet dies, dass die Lebensfähigkeit der Zellen in der Mitte des Biofilms noch höher als $82 \pm 12 \%$ gewesen sein muss. Innerhalb des Biofilms existieren (mindestens) zwei gegenläufige Gradienten, da die Laktatkonzentration zur Anode hin abnimmt, während der elektrische Biofilmwiderstand mit zunehmender Entfernung von der Anode zunimmt und damit den Elektronentransport behindert (Beyenal und Babauta, 2012). Daher kann grundsätzlich davon ausgegangen werden,

dass sich die lebensfähigsten Schichten innerhalb des zentralen Biofilms befinden, was hier durch die Lebend-Tot-Färbung bestätigt werden konnte.

Mehrere Studien haben bereits versucht, aktive Zonen innerhalb von Anoden-Biofilmen zu definieren, oft mit unterschiedlichen Ergebnissen. Während einige Studien eine lebende äußere Schicht mit einer toten Zone in Anodennähe fanden (Mai *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2017), berichteten andere vom Gegenteil (Steidl *et al.*, 2016; Franks *et al.*, 2012; Reguera *et al.*, 2006; Nevin *et al.*, 2008). Eine weitere neuere Analyse, bei der eine Durchflusszelle und ein Umweltinokulum verwendet wurden, deutet darauf hin, dass die meiste Stoffwechselaktivität in der Mitte der 42,5 - 60 μm dicken Anodenbiofilme stattfindet (Yang *et al.*, 2021). Diese unterschiedlichen Beobachtungen sind wahrscheinlich auf die in den Studien verwendeten unterschiedlichen Bedingungen zurückzuführen. Vor allem die Verwendung von Durchflusszellen im Vergleich zu Batch-Bedingungen hat vermutlich einen großen Einfluss. Dies gilt auch für die Biofilmstruktur, die sich ebenfalls abhängig von den Durchflussbedingungen verändert.

4.1.4 Zusammenfassende Erkenntnisse der Untersuchung kooperativer Anoden-Biofilm-Strukturen

In diesem Teil der vorliegenden Arbeit wurde eine neu etablierte automatisierte Plattform für die mikrofluidische (elektroaktive) Biofilmkultivierung und -analyse verwendet, um Anodenbiofilme von *S. oneidensis* und *G. sulfurreducens* zu untersuchen. In der Cokultur ist *G. sulfurreducens* auf die Acetatversorgung durch den Laktat-verstoffwechselnden *S. oneidensis* angewiesen, während *S. oneidensis* seinerseits die von *G. sulfurreducens* entwickelte leitfähige Biofilm-Matrix nutzt und

so den DIET zur Anode erleichtert. *S. oneidensis* bildet tubuläre Strukturen innerhalb der *G. sulfurreducens*-Matrix, ohne direkten Kontakt mit der Anodenoberfläche, und die Cokultur bildet dichte Biofilme, möglicherweise aufgrund von Co-Abhängigkeit. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich die Architektur exoelektrogener Biofilme dynamisch an die vorhandene Umgebung anpasst. Sie zeigen auch, dass DIET in Biofilmsystemen einfach realisiert werden kann, da der Zugang zum Elektronentransfernetzwerk der Nanowire möglich zu sein scheint. Darüber hinaus kann die entwickelte Plattform verwendet werden, um nahezu jede Kombination von Materialien und Organismen auf ihre zeitaufgelöste Wirkung auf die Biofilmbildung mit hohem Durchsatz, Vielseitigkeit und Reproduzierbarkeit hin zu untersuchen.

4.2 WbpA, WbpP, BpfA, BpfG und AggA als Schalter für die Biofilmentwicklung

S. oneidensis stellt aus mehrerlei Gründen den Organismus der Wahl für den künftigen Betrieb nachhaltiger MES dar, aber obwohl es der am besten untersuchte Modellorganismus für EET ist, sind die erreichbaren dissimilatorischen Eisenreduktionsraten und Stromdichten in MES verglichen mit *G. sulfurreducens* verhältnismäßig niedrig. Diese Arbeit basiert auf der Arbeitshypothese, dass dieser Unterschied vor allem in der konduktiveren EZM von *G. sulfurreducens* begründet liegt. Daher wurde in diesem Teil der Arbeit der Einfluss verschiedener Faktoren auf die Biofilmentwicklung fundamental untersucht. Darüber hinaus wurde untersucht, wie weit die endogene Fähigkeit von *S. oneidensis*, einen leitfähigen Biofilm auf einer Anode zu bilden, gesteigert werden kann und ob eine Korrelation zwischen bestimmten Biofilmparametern und der zu erwarteten Stromproduktion in einem MES feststellbar

sind.

4.2.1 Die Reduktion des EPS-Gehalts soll den Elektronentransfer in *S. oneidensis* MR-1 $\Delta\lambda$ erleichtern

Für die Untersuchung des Einflusses verschiedener Gene auf die Biofilmbildung wurde *S. oneidensis* MR-1 $\Delta\lambda$ als Wirtsstamm genutzt. In diesem Stamm ist der genomisch integrierte Prophage Lambda von Bursac *et al.* (2017) deletiert worden, was im Vergleich zum Wildtyp zu einer 1,34-fachen Erhöhung der Stromdichte und zu einer 2,3-fachen Erhöhung der Zellzahl an der Anode führte. Überraschenderweise, führte die $\Delta\lambda$ -Mutation unter den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Bedingungen zu einer drastischen Reduktion der Biofilmbildung. Bursac *et al.* (2017) nutzten BES-Batch-Reaktoren und grundsätzlich ist davon auszugehen, dass Biofilme sich unter diesen grundlegend unterschiedlichen Bedingungen anders verhalten. Zudem kann eine Zellzahlbestimmung nicht mit einer Untersuchung des Biovolumens mittels OCT verglichen werden. Bursac *et al.* (2017) haben die Zellzahl mittels qPCR des Anodenmaterials bestimmt. Die Quantifizierung von Mikroorganismen in einem Biofilm durch qPCR kann jedoch die Zellzahl aufgrund der Anwesenheit freier eDNA verfälschen (Azeredo *et al.*, 2017; Klein *et al.*, 2012), da Mutationen sowohl zu mehr als auch zu weniger eDNA in der EPS führen können (Kavanaugh *et al.*, 2019; Peng *et al.*, 2020) und somit mehr eDNA nicht zwingendermaßen auf mehr Zellen hinweisen muss.

Gödeke *et al.* (2011) konnten zeigen, dass die Biofilmbildung von *S. oneidensis* unter oxischen Bedingungen über eine Anfangsphase erfolgt, in der ein Teil der Population aufgrund der Aktivierung von Prophagen lysiert wird. Diese Lyse führt zu einer

Freisetzung von eDNA, die ein wichtiger Bestandteil der EPS ist, welche wiederum für die Biofilmbildung notwendig ist (Gödeke *et al.*, 2011; Flemming und Wingender, 2010). Durch die Deletion eines Phagen lysieren somit zwar anfangs weniger Zellen, aber durch das Ausbleiben der eDNA-Freisetzung wird die Biofilmbildung gehemmt. Dies konnte hier auch für eine Biofilmbildung unter anoxischen Bedingungen mit Fumarat als Elektronenakzeptor bestätigt werden.

Nun erscheint es zunächst etwas kontraintuitiv zur Verbesserung der Biofilmbildung einen Stamm zu nutzen, der deutlich weniger Biofilm zu bilden scheint als der Wildtyp. Jedoch reduziert die Deletion des Lambda-Phagen sowohl die genetische Plastizität als auch die anfängliche Zellyse vor der eigentlichen Biofilmbildung. Beides stellen Faktoren dar, welche die Verwendung von *S. oneidensis* in einem oberflächenabhängigen Produktionsprozess in Frage stellen (Bursac *et al.*, 2017). Zudem ist davon auszugehen, dass die $\Delta\lambda$ -induzierte EPS-Reduktion den Elektronentransport durch den Biofilm deutlich vereinfacht. Bestärkt wird diese Hypothese durch Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass extrazelluläre polymere Matrixkomponenten eine strombegrenzende Wirkung haben können (Kouzuma *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2019).

4.2.2 WbpA und WbpP als Schalter für die Biofilmbildung bei

S. oneidensis

Kürzlich wurde von Edel *et al.* (2021) gezeigt, dass Riboflavin bei *S. oneidensis* als Quorum-Sensing-Molekül wirkt und die Biofilmbildung unter anoxischen Bedingungen beschleunigt. Die externe Riboflavinkonzentration reguliert die Expression der Ornithindecaboxylase *speC* und ein erhöhter SpeC-Spiegel löst wiederum eine verstärkte Biofilmbildung aus. Bislang ist der Mechanismus der SpeC-vermittelten

Biofilmbildung nicht klar, scheint aber auf posttranskriptioneller Ebene abzulaufen. Eines der Proteine, das bei der SpeC-Überexpression überproduziert wurde, war die UDP-N-Acetylglucosamin-C4-Epimerase WbpP. Was die Funktion anbelangt, so scheint WbpP das einzige Protein der von SpeC betroffenen Proteingruppe zu sein, das eine direkte Funktion bei der EPS-Bildung hat, und es wurde zudem gezeigt, dass es in verschiedenen Mikroorganismen für die EPS-Produktion wichtig ist (Lee *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2006). In dieser Arbeit wurde untersucht, ob und wie WbpP die anaerobe Biofilmbildung von *S. oneidensis* verändern könnte und ob dies tatsächlich die erreichbaren Stromdichten in bioelektrochemischen Systemen beeinflussen kann. Darüber hinaus wurde ebenfalls *wbpA* untersucht, da es sich mit *wbpP* in einem Operon zu befinden scheint.

4.2.2.1 Die Überexpression von *wbpA* und *wbpP* führt zu signifikanten Veränderungen der Biofilmeigenschaften

Um den Einfluss der Überexpression von *wbpA*, *wbpP* sowie der Co-Überexpression beider Gene auf die Biofilmbildung von *S. oneidensis* zu untersuchen, wurden Biofilme mit Laktat als Elektronendonator und Fumarat als Elektronenakzeptor untersucht. Die Experimente legen nahe, dass die katalytische Wirkung von WbpA und WbpP die Eigenschaften des *S. oneidensis*-Biofilms verändern. Wie in Abb. 29 gezeigt, ist WbpA (SO_3190) eine UDP-N-Acetyl-D-Glucosamin-6-Dehydrogenase, die die Reaktionen von UDP-N-Acetyl-D-Galactosamin (UDP-GalNAc) zu UDP-N-Acetyl-D-Galactosaminuronsäure (UDP-GalNAcA) und UDP-N-Acetyl-D-Glucosamin (UDP-GlcNAc) zu UDP-N-Acetyl-D-Glucosaminuronsäure (UDP-GlcNAcA) katalysiert. WbpP (SO_3189) ist eine UDP-N-Acetylglucosamin-C4-Epimerase, die die Reaktionen von UDP-GlcNAc zu UDP-GalNAc und UDP-GlcNAcA zu UDP-GalNAcA

katalysiert. Sowohl GlcNAc als auch GalNAc sind sehr häufige Exopolysaccharide der mikrobiellen EZM (Vandana und Das, 2022; Sutherland, 2017). Was die Struktur der mit Laktat/Fumarat gewachsenen Biofilme betrifft, so scheint die katalytische Funktion von WbpA zu einheitlicheren Biofilmen zu führen, da die Porosität der *wbpA*- und *wbpAP*-überexprimierenden Biofilme geringer ist als die der Kontrolle und des Stammes, der nur *wbpP* überexprimiert. Dies könnte auf eine höhere Polarität der EZM als Folge der Oxidation einer Hydroxylgruppe zur entsprechenden Carbonsäure zurückzuführen sein. Im Gegensatz dazu scheint die Überexpression der Epimerase WbpP die stärksten Auswirkungen auf die Biofilmstrukturen zu haben. Die Porosität ist nach 35 und 50 Stunden im Vergleich zu allen anderen charakterisierten Stämmen deutlich höher, was sich in den Höhenkarten in dünneren einzelnen Biofilmtürmen widerspiegelt, die in den Anfangsstadien der Biofilmbildung auftreten. Mir ist keine andere Studie bekannt, die den Einfluss der Zucker-Stereochemie auf

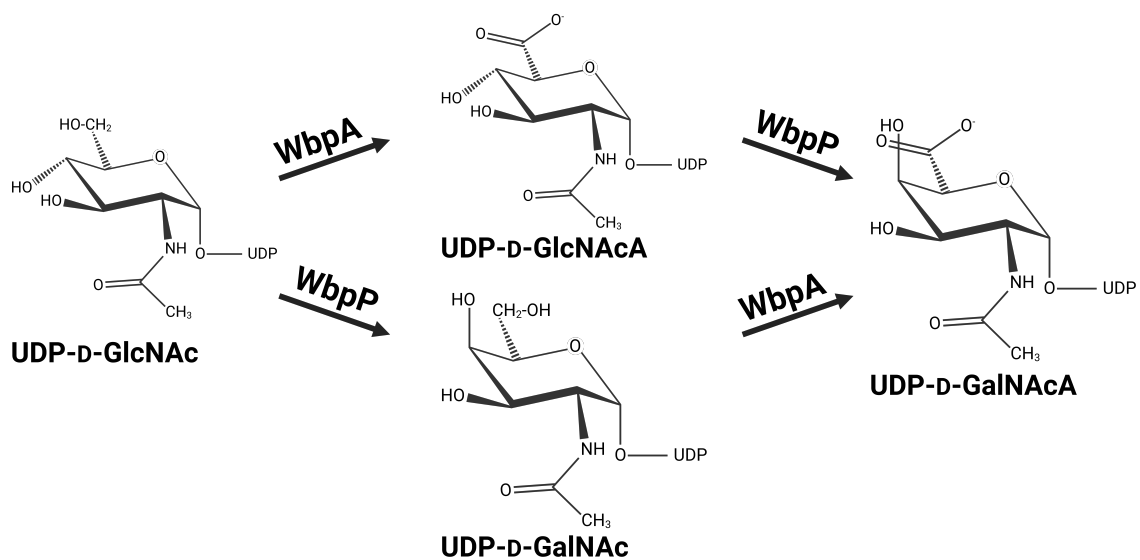


Abb. 29: **Von WbpA und WbpP katalysierte Reaktionen in *S. oneidensis*.** WbpA (SO_3190) ist eine UDP-N-Acetyl-D-Glucosamin-6-Dehydrogenase, welche die Reaktion von UDP-N-Acetyl-D-Galactosamin (UDP-GalNAc) zu UDP-N-Acetyl-D-Galactosaminuronsäure (UDP-GalNAcA) und UDP-N-Acetyl-D-Glucosamin (UDP-GlcNAc) zu UDP-N-Acetyl-D-Glucosaminuronsäure (UDP-GlcNAcA) katalysiert. WbpP (SO_3189) ist eine UDP-N-Acetylglucosamin-C4-Epimerase, die die Reaktionen von UDP-GlcNAc zu UDP-GalNAc und UDP-GlcNAcA zu UDP-GalNAcA katalysiert.

die Biofilmarchitektur bereits untersucht hat, sodass diese Ergebnisse nicht mit veröffentlichter Literatur verglichen werden können.

Es wurde bereits erwähnt, dass grundsätzlich angenommen wird, dass *Shewanella*-Wildtypstämme unter anoxischen Bedingungen nur dünne oder einschichtige Biofilme bilden. Die generierten Ergebnisse können diese generelle Unfähigkeit von *S. oneidensis* zur Bildung von Biofilmen in Abwesenheit von Sauerstoff nicht bestätigen, da mit Fumarat als Elektronenakzeptor Biofilme von mehr als 200 μm gebildet werden konnten.

4.2.2.2 Vermutlich ist die SpeC-abhängige Überproduktion von WbpAP der Grund für die erhöhte Stromproduktion durch Riboflavin-basiertes Quorum Sensing

Wie bereits mehrfach dargelegt, scheint *S. oneidensis* unter Verwendung einer Anode als einzigen terminalen Elektronenakzeptor nicht mehr in der Lage zu sein, mehrschichtige Biofilme zu bilden. Aufgrund der Nachweisgrenze des OCTs konnten keine Biofilmdaten gesammelt werden, sodass keine direkte Korrelation zwischen Biofilmarchitektur und Stromdichte hergestellt werden kann. Trotzdem ist davon auszugehen, dass die Eigenschaften der anoxischen Biofilme mit Fumarat als einzigem Elektronenakzeptor eindeutige Hinweise auf die Mechanismen liefern können, die Biofilmbildung und Stromerzeugung miteinander verbinden. Die gleichzeitige Überexpression von *wbpA* und *wbpP* führte zu einer 1,8-fachen Erhöhung der Stromdichte, und die Biofilme dieses Stammes wiesen unter Fumarat-atmenden Bedingungen ein ähnliches Biovolumen, jedoch eine geringere Porosität auf als die Kontrolle. Die *wbpA*-Überexpression führte offenbar zur Bildung von dünneren, jedoch dichteren Biofilmen. Interessanterweise führte dies allein nicht zu einer höheren

Stromproduktion, sondern erforderte auch die Aktivität der Epimerase WbpP. Es ist auffällig, dass der Anstieg der Stromproduktion nach der Überexpression von *wbpAP* fast genau dem entspricht, was Edel *et al.* (2021) nach der Überexpression von *speC* beobachtet haben (1,9-fach bzw. 1,8-fach). Daher scheint die SpeC-abhängige Überproduktion von WbpAP wahrscheinlich der Grund zu sein, warum Riboflavin-basiertes Quorum Sensing die Stromdichte erhöht. Dennoch kann im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen nicht festgestellt werden, warum sowohl Epimerisierung als auch Oxidation zusammen auftreten müssen, um den nachgewiesenen Effekt zu erzielen.

Wie bereits angedeutet, haben mehrere Studien gezeigt, dass extrazelluläre polymere Matrixkomponenten eine strombegrenzende Wirkung aufweisen können. Kouzuma *et al.* (2010) entdeckten, dass eine Störung des SO3177-Gens, welches an der Kapselbiosynthese beteiligt ist, zu einer Erhöhung der Stromdichte führen kann. Dies wurde korreliert mit einer geringeren EPS-Produktion und einer hydrophoberen Zelloberfläche. Darüber hinaus wiesen Gao *et al.* (2019) nach, dass das Abscheren der EPS-Matrix von *Shewanella*-Zellen dazu führte, dass die Zellen im Vergleich zum natürlichen Kontrollstamm eine bessere Elektronentransferkinetik aufweisen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse bezüglich WbpA und WbpP einen der wenigen Fälle darstellen, in denen eine Änderung der EPS-Zusammensetzung zur Anpassung der Stromdichte in BES genutzt werden kann. Die Herstellung von EPS ist sehr komplex und die Chemie der beteiligten Polymere ist bei weitem noch nicht vollständig verstanden. Somit könnten diese Untersuchungen den Grundstein legen, um die Auswirkungen der EPS-Chemie auf angewandte Biofilmprozesse zu ermitteln und die Leistung von Biofilmen in angewandten Prozessen durch die Steuerung der EPS-Chemie zu verbessern.

4.2.3 BpfA, BpfG und AggA als Schalter für die Biofilmbildung bei *S. oneidensis*

Aus den Untersuchungen von WbpA und WbpP kann die Hypothese abgeleitet werden, dass eine Verringerung der Biofilmporosität bei relativ ähnlichem Biofilmvolumen die Elektronentransferrate von *S. oneidensis* verbessert. Dies wirft die Frage auf, ob es sich hierbei um eine grundlegende Regel handelt, was bedeuten würde, dass zur Steigerung der Energieausbeuten in MES nicht nach Stämmen mit verstärkter Biofilmbildung gesucht werden müsste, sondern nach solchen, bei denen die Zellen dichter angeordnet sind. Aus diesem Grund wurden im nächsten Schritt Proteine untersucht, für die bereits eine Korrelation mit einer verbesserten Biofilmbildung nachgewiesen wurde. BpfA, BpfG und AggA sind Teil eines extrazellulären Proteinnetzwerks und ein Zusammenhang zur Biofilmbildung konnte nachgewiesen werden (Zhou *et al.*, 2015; De Windt *et al.*, 2006; Theunissen *et al.*, 2009; De Vriendt *et al.*, 2005). Der Einfluss dieser Proteine wurde systematisch schrittweise untersucht: Zunächst unter oxidischen Bedingungen mit atmosphärischem Sauerstoff als Elektronenakzeptor, anschließend unter anoxischen Bedingungen mit Fumarat als Elektronenakzeptor und abschließend unter Verwendung einer Anode als einzigen verfügbaren Elektronenakzeptor. Die Untersuchungen von *bpfA* und *bpfG* erfolgten genomisch, sodass der Wirtsstamm die Kontrolle darstellt. *aggA* wurde mit Hilfe eines durch Arabinose induzierbaren Expressionsplasmids untersucht und als Kontrolle diente der Wirtsstamm mit einem leeren Plasmid.

4.2.3.1 Übergeordnete Mechanismen bestimmen die Biofilmbildung unter oxischen Bedingungen bei *S. oneidensis*

Überraschenderweise wurden unter oxischen Bedingungen keine grundlegenden Abweichungen in der Biofilmarchitektur zwischen den fünf untersuchten Stämmen gefunden, die über punktuelle Unterschiede hinausgingen. Unter oxischen Bedingungen scheinen also eher übergeordnete Mechanismen als die untersuchten Mutationen wirksam zu werden und die Biofilmbildung zu bestimmen. Mir sind keine Studien bekannt, in denen der Unterschied zwischen oxischer und anoxischer Biofilmbildung grundlegend differenziert und untersucht wird. Daher ist es zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich, diese Hypothese mit anderen Studien zu vergleichen.

Den einzigen feststellbaren Unterschied stellte das labilere Wachstumsverhalten der BpfA- sowie BpfG-Mutante im Vergleich zum Kontrollstamm dar. Die Abscherung eines Biofilms kann zwar Teil des natürlichen Zyklus sein (siehe Abschnitt 1.3), da aber ein signifikanter Unterschied zum Kontrollstamm feststellbar war, ist davon auszugehen, dass die Biofilme der BpfA- und BpfG-Mutante tatsächlich labiler waren. Nach 93-stündiger Kultivierung wiesen die Stämme bereits Biofilmdicken von $215 \pm 9 \mu\text{m}$ (BpfA) und $185 \pm 28 \mu\text{m}$ (BpfG) auf. Der Elektronenakzeptor Sauerstoff muss in den Biofilm diffundieren und es ist anzunehmen, dass ab einer bestimmten Biofilmdicke anoxische Bedingungen überwiegen. Die Eindringtiefe von Sauerstoff hängt von mehreren Faktoren ab, darunter die Aktivität der Mikroorganismen und die Dichte des Biofilms, so dass kein allgemeiner Wert angegeben werden kann. Jedoch ist davon auszugehen, dass Sauerstoff in $100 \mu\text{m}$ Tiefe ganz oder zumindest fast vollständig metabolisiert wurde (Stewart, 2003; Hibiya *et al.*, 2004). Die Überexpression von *bpfA* erfolgte durch Ersetzen des nativen Promotors durch den Promotor von *cymA*. Da es sich bei CymA um ein *c*-Typ-Cytochrom handelt, das

für die anoxische Atmung von *S. oneidensis* unerlässlich ist, kann davon ausgegangen werden, dass es unter anoxischen Bedingungen stark transkriptionsinduziert ist. Daraus schließend findet die Überexpression von *bpfA* vermutlich erst in den tieferen sauerstofflimitierten Biofilmschichten statt. Kommt es in diesen Schichten vermehrt zur Ausbildung von BpfA, welches man auch als Zell-Zell-Kleber bezeichnen könnte, ist vorstellbar, dass es beim Ablösen einzelner Zellen aus dem Biofilmverband zu einer Art Kettenreaktion kommt, sodass der gesamte Biofilm abgeschert wird. Ein ähnlicher Mechanismus ist ebenfalls für die BpfG-Mutante vorstellbar, da durch eine Punktmutation BpfA nicht mehr sezerniert werden kann, was zu einem Anstieg des extrazellulären BpfA-Gehalts führen sollte. Auch hier würden einzelne sich aus dem Verband herauslösende Zellen zu einem Abscheren des gesamten Biofilms führen. Da es sich hier lediglich um Vermutungen handelt, müssten weitere Untersuchungen erfolgen. Zum Beispiel könnte der Durchfluss quantitativ untersucht werden, indem ein Verhältnis von Einzelzellen zu Zellen innerhalb von Aggregaten bestimmt wird. Für die beiden Mutantenstämme müssten dann im Vergleich zum Kontrollstamm mehr Zellen in Verbänden als Einzelzellen im Durchfluss feststellbar sein. Zum einen bieten sich Methoden der Rheologie an, um z. B. Viskositätsunterschiede zwischen den Stämmen bestimmen zu können (Macosko, 1994) und zum anderen könnten mittels Durchflussscytometrie quantitative Aussagen über das Vorkommen von Einzelzellen und Zellverbänden getätigt werden (Barr *et al.*, 2021; Merah-Mourah *et al.*, 2021).

4.2.3.2 Unter anoxischen Bedingungen wurden robuste Biofilme unterschiedlichster Architekturen gebildet

Unter anoxischen Bedingungen mit Fumarat als einzigem Elektronenakzeptor wurden signifikante Unterschiede zwischen den Stämmen festgestellt. Zunächst war insbe-

sondere die deutlich erhöhte Wachstumsgeschwindigkeit der anoxisch kultivierten Biofilme im Vergleich zu den oxischen Versuchen überraschend. Bedenkt man jedoch, dass die Löslichkeit von Sauerstoff aus der Umgebungsluft bei 30 °C 8,05 mg l⁻¹ und demnach nur 252 µM beträgt (berechnet nach den Angaben in *International Critical Tables*, 1928, vol. III, McGraw-Hill, New York, p. 257) und dass in den anoxischen Experimenten 100 mM gelöstes Fumarat als Elektronenakzeptor verwendet wurde, ist die deutlich erhöhte Wachstumsrate nicht überraschend. Zudem muss, wie auch in Abschnitt 4.2.2.1, erneut betont werden, dass die Annahme, dass *S. oneidensis* unter Ausschluss von Sauerstoff nur dünne Biofilme bildet, nicht bestätigt werden kann, da im Rahmen dieser Versuche Biofilme mit einer Höhe von bis zu 180 µm nach 50 Stunden gebildet wurden.

Im Vergleich zu den oxischen Versuchen haben alle fünf untersuchten Stämme unter Ausschluss von Sauerstoff robuste Biofilme gebildet, ohne innerhalb des Versuchszeitraums von 50 Stunden abgeschert zu werden. Es scheint daher wahrscheinlich, dass die Instabilität eher bei stärkeren Gradienten zum Tragen kommt. Dass Sauerstoffarmut in den tieferen Biofilmschichten zur Disaggregation und Ablösung führen kann, ist hinreichend belegt (Wille und Coenye, 2020; Rumbaugh und Sauer, 2020; Petrova und Sauer, 2016). Zudem liegt in diesen Versuchen, wie bereits erwähnt, der Elektronenakzeptor in wesentlich höherer Molarität vor, was einen Massentransport in tiefere Biofilmschichten erleichtert.

Die *aggA*-Überexpression führte zur Ausbildung von signifikant dichteren Biofilmen bei ungefähr gleichbleibendem Biovolumen und Biofilmhöhe im Vergleich zur Kontrolle mit dem leeren Plasmid. Den Hypothesen aus dem vorangegangenen Abschnitt 4.2.2 folgend, entspricht dies genau den Erwartungen. AggA, stehend für *agglutination protein*, wird häufig als Zellkleber bezeichnet, sodass ein erhöhtes Vorkommen

voraussichtlich zu einem Verklumpen der Zellen und damit einer Verringerung der Porosität führt. BpfA wird, wie bereits erwähnt, ebenfalls als Zellkleber bezeichnet, weshalb es umso überraschender ist, dass diese Mutante im Vergleich zum Kontrollstamm ein reduziertes Biovolumen und eine vergleichbare Biofilmhöhe, aber deutlich porösere Biofilme nach 43 Stunden aufwies. Die BpfG-Mutation führte zwar zu mehr Biovolumen und höheren Biofilmen, aber ebenfalls zu signifikant poröseren Biofilmen nach 43 Stunden. Der Theorie bezüglich WbpA und WbpP folgend, dass eine annähernd gleichbleibende Biofilmmenge bei Reduktion der Porosität den interzellulären Elektronentransport vereinfacht und somit zur Erhöhung der Stromausbeute führt, deutet an dieser Stelle insbesondere auf den *aggA*-überexprimierenden Stamm als vielversprechenden Kandidaten hin. Überraschenderweise ist ebenfalls die Expression eines leeren Plasmids in Bezug auf die zu erwartende Stromdichte vielversprechend (siehe auch Abb. A9). Bei Vergleich der beiden Kontrollstäme konnte festgestellt werden, dass die Zugabe des leeren Plasmids zu keiner Änderung des Biovolumens oder der Biofilmhöhe führte, die Biofilme aber signifikant dichter waren. Da der BpfA- sowie der BpfG-Stamm signifikant porösere Biofilme aufwiesen, wäre für diese Stämme eine Reduktion der Stromproduktion zu erwarten gewesen.

4.2.3.3 Zusammenhang zwischen Biofilmarchitektur und Stromdichte ist komplexer als erwartet

Bei Verwendung einer Anode als einzigem Elektronenakzeptor wurde eine 1,85-fache Erhöhung der mittleren Stromdichte für den BpfA-Stamm und eine 1,83-fache Erhöhung für den BpfG-Stamm im Vergleich zum Kontrollstamm ermittelt, wobei nur der letztere Wert signifikant war. Die Zugabe des leeren Plasmids führte ebenfalls zu einer 1,67-fachen Erhöhung der Stromdichte im Vergleich zur Kontrolle ohne

Plasmid. Obwohl der *aggA*-überexprimierende Stamm, wie im letzten Abschnitt erläutert, der vielversprechendste Stamm war, konnte keine signifikante Erhöhung der Stromdichte festgestellt werden. Da es sich sowohl bei AggA als auch bei BpFA um sogenannte interzelluläre Kleber handelt, ist es überraschend, dass nur eins der beiden untersuchten Proteine zu einer Erhöhung der Stromausbeute führte. Auch dass bereits eine Vielzahl an vielversprechenden Untersuchungen in Bezug auf AggA bei *Shewanella*-Spezies veröffentlicht wurden, ist überraschend (Liang *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2015; Zacharoff *et al.*, 2016; Theunissen *et al.*, 2009; Theunissen *et al.*, 2010; De Vriendt *et al.*, 2005; De Windt *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2013). Es stellt sich intuitiverweise die Frage, ob *aggA* tatsächlich überexprimiert wurde. Eine Überprüfung der Transkriptionsstärke mittels qPCR oder sogar eine posttranskriptionelle Kontrolle mittels Proteomanalyse sollten in Betracht gezogen werden, um dies zu untersuchen. Dass unter Verwendung von Fumarat als Elektronenakzeptor sowohl qualitativ als auch quantitativ Unterschiede im Vergleich zum Kontrollstamm gefunden werden konnten, spricht jedoch eher dafür, dass die Überexpression dieses Gens einfach nicht zum erwarteten Ergebnis führte.

Ebenfalls überraschend war die Erhöhung der Stromdichte durch die einfache Zugabe eines leeren Plasmids. Schmid *et al.* (2021) haben einen ähnlichen Effekt bei *Rhodobacter sphaeroides* in kathodischen BES beobachtet. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Einführung eines Plasmidvektors als auch die Exposition gegenüber dem entsprechenden antibiotischen Selektionsdruck eine starke Verbesserung sowohl der kathodischen Biofilmbildung als auch der elektrochemischen Eigenschaften bewirkte. Um die Veränderungen auf molekularer Ebene zu untersuchen, könnte eine vergleichende Transkriptom- oder Proteomanalyse der Kontrollstämmen mit und ohne Plasmid in Betracht gezogen werden. Differentiell regulierte Gene oder Proteine könnten zudem potentielle zukünftige Ziele darstellen, um die erreichbaren

Stromdichten weiter zu erhöhen, aber auch um die Biofilmbildung von *S. oneidensis* grundlegend besser zu verstehen.

4.2.4 Zusammenfassende Erkenntnisse bezüglich WbpA, WbpP, AggA, BpfA und BpfG

Im Rahmen dieser Arbeit ist der Einfluss von fünf verschiedenen Proteinen (WbpA, WbpP, AggA, BpfA und BpfG) auf die Biofilmbildung von *S. oneidensis* systematisch untersucht worden. Ziel war es, Stämme mit einer erhöhten Stromdichte zu identifizieren und zu versuchen, einen Zusammenhang zwischen Biofilmarchitektur und Stromproduktion zu finden. Unter oxischen Bedingungen haben übergeordnete Mechanismen die Biofilmbildung bestimmt. Dahingegen konnten unter anoxischen Bedingungen mit Fumarat als Elektronenakzeptor sowohl qualitative als auch quantitative Unterschiede zwischen den Mutanten und den Kontrollstämmen festgestellt werden. Unter Nutzung einer Anode als terminalen Elektronenakzeptor führten die Co-Überexpression von *wbpA* und *wbpP*, die Überexpression von *bpfA*, eine punktmutierte *bpfG*-Variante sowie die einfache Zugabe eines leeren Plasmidvektors zur 1,67 - 1,85-fachen Erhöhung der mittleren Stromdichte. Obwohl einige Hypothesen aufgestellt werden konnten, z. B. dass dichtere Biofilme vermutlich den interzellulären Elektronentransport erleichtern, konnte kein grundlegender Zusammenhang zwischen Biofilmparametern und Elektronentransport festgestellt werden.

Da BpfA an der äußeren Membran lokalisiert ist, sollte in Betracht gezogen werden, dass die Ergebnisse bezüglich BpfA und BpfG möglicherweise nicht auf die Veränderungen der Biofilmbildung selber zurückzuführen sind. An der äußeren Membran erfolgt der letzte Schritt des EET, sodass grundsätzlich vorstellbar ist,

dass eine Veränderung von Proteinen, die mit der äußeren Membran assoziiert sind, in die Elektronentransfermaschinerie eingreifen kann. Dies stellt jedoch eine reine Vermutung dar, welche auf Grundlage der durchgeführten Versuche nicht diskutierbar ist. Weitere Untersuchungen wären notwendig, um die molekularen Hintergründe der untersuchten Proteine aufzuklären.

In dieser Arbeit wurde bereits mehrfach darauf verwiesen, dass die Biofilmbildung von *S. oneidensis* zwar unter oxischen Bedingungen gut untersucht, das Wissen über die Biofilmbildung unter anoxischen Bedingungen jedoch eher spärlich ist. Ich habe den Eindruck gewonnen, dass allgemein angenommen wird, dass die Mechanismen der oxischen Biofilmbildung grundlegende Mechanismen darstellen, die für alle Bedingungen gleichermaßen gelten. In dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass aus der Architektur oxischer Biofilme keine Rückschlüsse auf die Architektur anoxischer Biofilme gezogen werden können, ebenso wie keine eindeutigen Indikatoren anoxischer Biofilme gefunden werden konnte, die Rückschlüsse auf die Stromdichte in MEZ zulassen. Ich bin der Meinung, dass es systematischer grundlegender Untersuchungen der Biofilmbildung in *S. oneidensis* bedarf, bei der verschiedene Bedingungen, wie z. B. unterschiedliche Elektronenakzeptoren, miteinander verglichen werden. Die Entwicklung sollte dabei so engmaschig und in Echtzeit überwacht werden, wie möglich. Im Rahmen dieser Arbeit konnte deutlich gezeigt werden, dass sich eine Überwachung mittels OCT anbietet, da sie nicht-invasiv und beinahe in Echtzeit durchführbar ist. Die Auflösungsgrenze und die damit einhergehende aufnehmbare Größe stellen in den meisten Fällen einen guten Kompromiss dar. Nur unter Elektroden-atmenden Bedingungen sollte zukünftig versucht werden, ebenfalls eine mikroskopische Analytik zu implementieren, da die Biofilme von *S. oneidensis* unter diesen Bedingungen unter der Nachweisgrenze des OCTs liegen. Grundsätzlich ist eine mikroskopische Auswertung der mikrofluidischen Reaktoren einfach durchführbar, da die PDMS-

basierten Körper mit einem Standardobjektträger verschlossen werden und somit einfach in ein Mikroskop eingelegt werden können. Hierbei gilt es jedoch zu bedenken, dass somit der Biofilm von der Glasseite aus analysiert werden würde. Die verwendeten Objektträger hatten eine Stärke von 1 mm und der Kultivierungskanal eine Höhe von 2 mm, was insbesondere bei der Auswahl eines passenden Mikroskopobjektivs bezüglich des Arbeitsabstands eine Rolle spielt. Außerdem werden mikroskopische Untersuchungen von mikrofluidischen Reaktoren in den allermeisten Fällen als Endpunktanalysen durchgeführt, was in erster Linie darauf zurückzuführen ist, dass sich das Mikroskop in einem anderen Raum befindet. Automatisiert man wiederum die mikroskopischen Analysen indem die Biofilmkultivierung direkt unter dem Mikroskop durchgeführt wird, ist eine Kultivierung bei konstanter vergleichbarer Temperatur ein Problem. Die vergleichenden Untersuchungen von Biofilmen sollten unter möglichst präzisen Bedingungen durchgeführt werden, um systematische Fehlerquellen zu minimieren und es wird deutlich, dass zumeist ein Kompromiss zwischen den Kultivierungsbedingungen und durchführbaren Analysen gefunden werden muss.

Eine weitere Herausforderung stellen die niedrigen Stromdichten von *S. oneidensis* dar. Die manuelle Herstellung der mikrofluidischen Reaktoren bietet zwar die Möglichkeit die Geometrien präzise an benötigte Kultivierungsbedingungen anzupassen, doch ist die manuelle Fertigung naturgemäß immer mit einem gewissen Schwankungsbereich verbunden. Bei Stromdichten im Nanoamperebereich haben kleinste Schwankungen natürlich einen erheblichen Einfluss und sollten daher als systematische Fehlerquelle mitbedacht werden. Darüber hinaus ist die manuelle Herstellung äußerst zeitaufwendig, so dass eine Automatisierung sowohl die Fehlerquote der Strommessungen als auch den Zeitaufwand verringern würde. Ich gehe davon aus, dass bei Reduktion der Fehlerquote auch die BpfA-Mutation zu einer signifikanten Erhöhung der Stromdichte führt.

Abschließend lässt sich sagen, dass die entwickelte Kultivierungsplattform die Untersuchung von Biofilmen erheblich vereinfacht. Es stehen Aufnahme- und Auswerterroutinen verschiedener Parameter, wie Biovolumen, Biofilmhöhe oder -porosität, zur Verfügung, sodass Biofilme standardisiert überwacht und beschrieben werden können. Trotzdem stellen diese Parameter letztlich nur eine Abstraktion der Realität dar mit dem Anspruch, Biofilme so realitätsnah wie möglich zu beschreiben. Die Untersuchung von Biofilmen als multizelluläre Komplexe unterscheidet sich grundlegend von der Untersuchung suspendierter Zellen und diese Komplexität schreckt Forschende zum Teil ab. Da Biofilme jedoch die primäre Lebensform von Bakterien darstellen und z. B. in biotechnologischen Prozessen ein enormes Potential bieten, sollte auf die Untersuchung von Biofilmen keinesfalls verzichtet, sondern die Forschung an diesen weiter ausgebaut werden. Zudem bin ich der Meinung, dass es bei der Erforschung von Biofilmen noch spannende grundlegende Erkenntnisse aufzudecken gibt, die unser Verständnis über Mikroorganismen erweitern und verändern werden.

4.3 Ausblick

Die Untersuchung der elektroaktiven Modellgemeinschaft sollte einen Maßstab liefern, welche Stromausbeuten unter natürlichen Bedingungen erreicht werden können. Obwohl die Stromausbeute um das bis zu 1,9-fache erhöht werden konnte, ist dies immer noch 150-fach geringer im Vergleich zur *S. oneidensis* / *G. sulfurreducens*-Cokultur und 250-fach geringer als *G. sulfurreducens* alleine. Trotz der Verbesserungen muss an diesem Punkt davon ausgegangen werden, dass *S. oneidensis* unter natürlichen Bedingungen wesentlich weniger Strom produziert als *Geobacter*-Spezies. Durch die Untersuchung der Biofilmarchitektur-verändernden Proteine, die an dieser Stelle auch als Biofilmschalter bezeichnet werden könnten, sind Schlüsselfaktoren aufgedeckt

worden, mit der die Biofilmbildung anaerob reguliert werden kann. Anschließend an diese Arbeit sollte daher untersucht werden, inwiefern konduktive Strukturen in diese Biofilme eingeführt werden können. Konduktive Strukturen können hierbei sowohl biotischen Ursprungs sein, wie beispielsweise extrahierte *Geobacter*-Nanowire, sowie auch abiotischen Ursprungs, wie leitfähige Nanopartikel. Aber selbst wenn die Leitfähigkeit eines Biofilms durch künstliche Zugabe von konduktiven Strukturen erhöht wird, muss trotzdem sichergestellt sein, dass die Zellen des Biofilms zusammenhalten und eine stabile EZM bilden. Die Stämme, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht und charakterisiert wurden, können also als Wirtsstämme für diese Untersuchungen verwendet werden. Mit anderen Worten weiß man zum aktuellen Zeitpunkt, wie Biofilme bestimmter Eigenschaften kultiviert werden können und im nächsten Schritt sollte versucht werden synthetische konduktive Strukturen in diese Biofilme einzubauen.

Zudem wäre es wichtig zu untersuchen, ob die im Rahmen dieser Arbeit aufgedeckten Effekte kombinierbar und die Stromausbeuten noch weiter erhöhbar sind. Da alle Proteine in der Lage waren, die Biofilmarchitektur unter Verwendung von Fumarat als Elektronenakzeptor stark zu verändern, können sie als Schalter der Biofilmbildung betrachtet werden. Würde man induzierbare Promotoren einsetzen, könnten durch alternierendes Zupumpen des Induktors mutmaßlich die Biofilmeigenschaften phasenweise verändert werden. Auch denkbar wäre das präzise Zusammenbauen eines Biofilms aus mehreren Stämmen als Bausteine, zum Beispiel schichtweise. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass ein aktualisiertes Raumportal mit integrierter Probennahme und -injektion in Zusammenarbeit mit René Wurst und der Forschungswerkstatt Elektrotechnik der TUHH (Bernd Hüttmeyer und Nils Grünke) entwickelt wurde und sich bereits in der Endphase der Fertigstellung befindet. Durch einen integrierten Spritzenantrieb und einer an der z-Achse loka-

lisierten Kanüle können zukünftig nicht nur Proben zur Analyse mikrometer- und mikrolitergenau aus Biofilmen entnommen werden, sondern ebenfalls Proben oder Zellen (oder beispielsweise Nanopartikel) direkt in den Biofilm injiziert werden. Das neue Raumportal bietet einen größeren Arbeitsraum von 1.900 x 650 x 250 mm (x/y/z; bisher: 800 x 800 x 50 mm), was knapp einer Verdopplung der Arbeitsfläche entspricht. Die Wiederholgenauigkeit des neuen Portals wird außerdem 120 μm im Vergleich zu 500 μm beim alten System betragen. Bisher war die OCT-Bildaufnahme semi-automatisiert. Für das neue System wurde eine eigene Software mit einer Eingabemaske entworfen, in die Bildparameter sowie Zeit- und Ortsangaben eine volle Automatisierung der OCT-Prozessroutine ermöglichen. Die Integration dieses optimierten Raumportals wird die Reproduzierbarkeit der Biofilmkultivierung und -analyse weiter erhöhen und die aktive Arbeitszeit weiter reduzieren.

Meiner Meinung nach stellt dann die OCT-Datenauswertung die nächste größere Herausforderung dar. Im Durchschnitt ist ein einzelnes OCT-Bild ≈ 4 GB groß und für die Aufzeichnung des gesamten Kultivierungskanals sind fünf Aufnahmen erforderlich. Ein Triplikat mit fünf Aufnahmezeitpunkten entspricht somit etwa 300 GB an OCT-Daten. Dies bedeutet einen immensen Bedarf an Speicherplatz, Zeit für die Datenübertragung sowie die Prozessierung der Bilddaten. Obwohl die Prozessierung der Datensätze bereits teilweise automatisiert ist, sind einige Schritte immer noch für jede Aufnahme manuell durchzuführen. Eine volle Automatisierung der Prozessierung würde eine erhebliche Reduktion der Arbeitszeit und zudem vermutlich eine Erhöhung der Reproduzierbarkeit bedeuten.

Zusammengenommen entwickelt sich die mikrofluidische Biofilmkultivierung mit Hilfe der beschriebenen Plattform in eine vollautomatisierte Zukunft, die es ermöglichen wird Biofilme im Hochdurchsatz zu kultivieren und *in situ* zu analysieren. Somit

können z. B. die unterschiedlichsten Umweltbedingungen, Elektrodenmaterialien oder Stammmodifikationen reproduzierbar in deutlich kürzeren Zeiträumen kultiviert und analysiert werden. Dieser multidisziplinäre Ansatz mit systematischer multidimensionaler Analyse der Mikroorganismen-Elektroden-Schnittstelle ermöglicht Untersuchungen, die entscheidende Schritte in Richtung einer industriellen Anwendung mikrobieller elektrochemischer Systeme möglich machen.

Literaturverzeichnis

- Amann, R. I., B. J. Binder, R. J. Olson, S. W. Chisholm, R. Devereux und D. A. Stahl. (1990). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology*. **56**:1919–1925.
- Azeredo, J., N. F. Azevedo, R. Briandet, N. Cerca, T. Coenye, A. R. Costa, M. Desvaux, G. Di Bonaventura, M. Hébraud, Z. Jaglic, M. Kačániová, S. Knøchel, A. Lourenço, F. Mergulhão, R. L. Meyer, G. Nychas, M. Simões, O. Tresse und C. Sternberg. (2017). Critical review on biofilm methods. *Critical Reviews in Microbiology*. **43**:313–351.
- 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.
- Balzer, M., N. Witt, H. C. Flemming und J. Wingender. (2010). Faecal indicator bacteria in river biofilms. *Water Science & Technology*. **61**:1105–1111.
- Baron, D., E. LaBelle, D. Coursolle, J. A. Gralnick und D. R. Bond. (2009). Electrochemical measurement of electron transfer kinetics by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Journal of Biological Chemistry*. **284**:28865–28873.
- Barr, D. A., C. Omollo, M. Mason, A. Koch, R. J. Wilkinson, D. G. Lalloo, G. Meintjes, V. Mizrahi, D. F. Warner und G. Davies. (2021). Flow cytometry method for absolute counting and single-cell phenotyping of mycobacteria. *Scientific Reports*. **11**:18661.
- Beegle, J. R. und A. P. Borole. (2018). Exoelectrogens for Microbial Fuel Cells. *Progress and Recent Trends in Microbial Fuel Cells*. **12**:193–230.

- Beyenal, H. und J. T. Babauta. (2012). Microscale gradients and their role in electron-transfer mechanisms in biofilms. *Biochemical Society transactions*. **40**:1315.
- 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.
- Bond, D. R., D. E. Holmes, L. M. Tender und D. R. Lovley. (2002). Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments. *Science*. **295**:483–485.
- Bond, D. R. und D. R. Lovley. (2003). Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**:1548–1555.
- Bond, D. R., S. M. Strycharz-Glaven, L. M. Tender und C. I. Torres. (2012). On Electron Transport through *Geobacter* Biofilms. *ChemSusChem*. **5**:1099–1105.
- 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**:23.
- Bursac, T., J. A. Gralnick und J. Gescher. (2017). Acetoin production via unbalanced fermentation in *Shewanella oneidensis*. *Biotechnology and Bioengineering*. **114**:1283–1289.
- 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.
- Cao, Y., M. Song, F. Li, C. Li, X. Lin, Y. Chen, Y. Chen, J. Xu, Q. Ding und H. Song. (2019). A synthetic plasmid toolkit for *Shewanella oneidensis* MR-1. *Frontiers in Microbiology*. **10**:438526.

- Cheng, Z. H., J. R. Xiong, D. Min, L. Cheng, D. F. Liu, W. W. Li, F. Jin, M. Yang und H. Q. Yu. (2020). Promoting bidirectional extracellular electron transfer of *Shewanella oneidensis* MR-1 for hexavalent chromium reduction via elevating intracellular cAMP level. *Biotechnology and Bioengineering*. **117**:1294–1303.
- Coenye, T. und H. J. Nelis. (2010). *In vitro* and *in vivo* model systems to study microbial biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*. **83**:89–105.
- Corts, A. D., L. C. Thomason, R. T. Gill und J. A. Gralnick. (2019). A new recombineering system for precise genome-editing in *Shewanella oneidensis* strain MR-1 using single-stranded oligonucleotides. *Scientific Reports*. **9**:1–10.
- Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber und H. M. Lappin-Scott. (1995). Microbial biofilms. *Annual review of microbiology*. **49**:711–745.
- Covington, E. D., C. B. Gelbmann, N. J. Kotloski und J. A. Gralnick. (2010). An essential role for UshA in processing of extracellular flavin electron shuttles by *Shewanella oneidensis*. *Molecular Microbiology*. **78**:519–532.
- Crivello, G., L. Fracchia, G. Ciardelli, M. Boffito und C. Mattu. (2023). In Vitro Models of Bacterial Biofilms: Innovative Tools to Improve Understanding and Treatment of Infections. *Nanomaterials*. **13**:904.
- De Vriendt, K., S. Theunissen, W. Carpentier, L. De Smet, B. Devreese und J. Van Beeumen. (2005). Proteomics of *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilm reveals differentially expressed proteins, including AggA and RibB. *PROTEOMICS*. **5**:1308–1316.
- De Windt, W., H. Gao, W. Krömer, P. Van Damme, J. Dick, J. Mast, N. Boon, J. Zhou und W. Verstraete. (2006). AggA is required for aggregation and increased biofilm formation of a hyper-aggregating mutant of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Microbiology*. **152**:721–729.
- Dehio, C. und M. Meyer. (1997). Maintenance of broad-host-range incompatibility group P and group Q plasmids and transposition of Tn5 in *Bartonella henselae*

- following conjugal plasmid transfer from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. **179**:538.
- Dhar, B. R., J. Sim, H. Ryu, H. Ren, J. W. Santo Domingo, J. Chae und H. S. Lee. (2017). Microbial activity influences electrical conductivity of biofilm anode. *Water research*. **127**:230.
- Dolch, K., J. Danzer, T. Kabbeck, B. Bierer, J. Erben, A. H. Förster, J. Maisch, P. Nick, S. Kerzenmacher und J. Gescher. (2014). Characterization of microbial current production as a function of microbe–electrode–interaction. *Bioresource Technology*. **157**:284–292.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*. **8**:881–890.
- Dower, W. J., J. F. Miller und C. W. Ragsdale. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic acids research*. **16**:6127–6145.
- Edel, M., H. Horn und J. Gescher. (2019). Biofilm systems as tools in biotechnological production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **103**:5095–5103.
- Edel, M., G. Sturm, K. Sturm-Richter, M. Wagner, J. N. Ducassou, Y. Couté, H. Horn und J. Gescher. (2021). Extracellular riboflavin induces anaerobic biofilm formation in *Shewanella oneidensis*. *Biotechnology for Biofuels*. **14**:130.
- Edwards, M. J., G. F. White, J. N. Butt, D. J. Richardson und T. A. Clarke. (2020). The Crystal Structure of a Biological Insulated Transmembrane Molecular Wire. *Cell*. **181**:665–673.
- 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**:60.
- Filman, D. J., S. F. Marino, J. E. Ward, L. Yang, Z. Mester, E. Bullitt, D. R. Lovley und M. Strauss. (2019). Cryo-EM reveals the structural basis of long-range electron

- transport in a cytochrome-based bacterial nanowire. *Communications Biology*. **2**:219.
- 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.
- Franks, A. E., R. H. Glaven und D. R. Lovley. (2012). Real-Time Spatial Gene Expression Analysis within Current-Producing Biofilms. *ChemSusChem*. **5**:1092–1098.
- Gambari, C., A. Boyeldieu, J. Armitano, V. Méjean und C. Jourlin-Castelli. (2019). Control of pellicle biogenesis involves the diguanylate cyclases PdgA and PdgB, the c-di-GMP binding protein MxdA and the chemotaxis response regulator CheY3 in *Shewanella oneidensis*. *Environmental Microbiology*. **21**:81–97.
- Gao, L., X. Lu, H. Liu, J. Li, W. Li, R. Song, R. Wang, D. Zhang und J. Zhu. (2019). Mediation of extracellular polymeric substances in microbial reduction of hematite by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Frontiers in Microbiology*. **10**:437935.
- Gao, T., M. Shi und H. Gao. (2018). Partially reciprocal replacement of FlrA and FlrC in regulation of *Shewanella oneidensis* flagellar biosynthesis. *Journal of Bacteriology*. **200**:00796–17.
- Gibson, D. G., L. Young, R. Y. Chuang, J. C. Venter, C. A. Hutchison und H. O. Smith. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature methods*. **6**:343–345.
- Gödeke, J., L. Binnenkade und K. M. Thormann. (2012). Transcriptome Analysis of Early Surface-Associated Growth of *Shewanella oneidensis* MR-1. *PLOS ONE*. **7**:e42160.

- Gödeke, J., K. Paul, J. Lassak und K. M. Thormann. (2011). Phage-induced lysis enhances biofilm formation in *Shewanella oneidensis* MR-1. *The ISME journal*. **5**:613–626.
- Gralnick, J. A. und D. K. Newman. (2007). Extracellular respiration. *Molecular Microbiology*. **65**:1–11.
- Gu, Y., M. J. Guberman-Pfeffer, V. Srikanth, C. Shen, F. Giska, K. Gupta, Y. Londer, F. A. Samatey, V. S. Batista und N. S. Malvankar. (2023). Structure of *Geobacter* cytochrome OmcZ identifies mechanism of nanowire assembly and conductivity. *Nature Microbiology*. **8**:284–298.
- Gu, Y., V. Srikanth, A. I. Salazar-Morales, R. Jain, J. P. O'Brien, S. M. Yi, R. K. Soni, F. A. Samatey, S. E. Yalcin und N. S. Malvankar. (2021). Structure of *Geobacter* pili reveals secretory rather than nanowire behaviour. *Nature*. **597**:430–434.
- Güssow, D. und T. Clackson. (1989). Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research*. **17**:4000.
- Haddock, B. A. und H. U. Schairer. (1973). Electron-Transport Chains of *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*. **35**:34–45.
- 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**:8933.
- 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.
- Hartshorne, R. S., C. L. Reardon, D. Ross, J. Nueter, T. A. Clarke, A. J. Gates, P. C. Mills, J. K. Fredrickson, J. M. Zachara, L. Shi, A. S. Beliaev, M. J. Marshall, M. Tien, S. Brantley, J. N. Butt und D. J. Richardson. (2009). Characterization of

- an electron conduit between bacteria and the extracellular environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **106**:22169.
- 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.
- Hengge, R. (2009). Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*. **7**:263–273.
- Heuschkel, I., S. Hanisch, D. C. Volke, E. Löfgren, A. Hoschek, P. I. Nickel, R. Karande und K. Bühler. (2021). *Pseudomonas taiwanensis* biofilms for continuous conversion of cyclohexanone in drip flow and rotating bed reactors. *Engineering in Life Sciences*. **21**:258–269.
- Hibiya, K., J. Nagai, S. Tsuneda und A. Hirata. (2004). Simple prediction of oxygen penetration depth in biofilms for wastewater treatment. *Biochemical Engineering Journal*. **19**:61–68.
- Holmes, D. E., S. K. Chaudhuri, K. P. Nevin, T. Mehta, B. A. Methé, A. Liu, J. E. Ward, T. L. Woodard, J. Webster und D. R. Lovley. (2006). Microarray and genetic analysis of electron transfer to electrodes in *Geobacter sulfurreducens*. *Environmental Microbiology*. **8**:1805–1815.
- Hu, Y., Y. Wang, X. Han, Y. Shan, F. Li und L. Shi. (2021). Biofilm Biology and Engineering of *Geobacter* and *Shewanella* spp. for Energy Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. **9**:1252.

- Huggett, M. J., G. R. Crocetti, S. Kjelleberg und P. D. Steinberg. (2008). Recruitment of the sea urchin *Heliocidaris erythrogramma* and the distribution and abundance of inducing bacteria in the field. *Aquatic Microbial Ecology*. **53**:161–171.
- Inoue, K., C. Leang, A. E. Franks, T. L. Woodard, K. P. Nevin und D. R. Lovley. (2011). Specific localization of the *c*-type cytochrome OmcZ at the anode surface in current-producing biofilms of *Geobacter sulfurreducens*. *Environmental Microbiology Reports*. **3**:211–217.
- Kadier, A., M. S. Kalil, P. K. Rai, S. S. Kumar, P. Abdeshahian, P. Sivagurunathan, H. A. Hasan, A. A. Hamid und A. Mohamed. (2019). Microbial Electrolysis Cells (MECs). In: Krishnaraj, R. N. und R. K. Sani *Bioelectrochemical Interface Engineering* (S. 209–234): John Wiley Sons, Ltd.
- Kadier, A., Y. Simayi, P. Abdeshahian, N. F. Azman, K. Chandrasekhar und M. S. Kalil. (2016). A comprehensive review of microbial electrolysis cells (MEC) reactor designs and configurations for sustainable hydrogen gas production. *Alexandria Engineering Journal*. **55**:427–443.
- Kavanaugh, J. S., C. E. Flack, J. Lister, E. B. Ricker, C. B. Ibberson, C. Jenul, D. E. Moormeier, E. A. Delmain, K. W. Bayles und A. R. Horswill. (2019). Identification of extracellular DNA-binding proteins in the biofilm matrix. *mBio*. **10**:01137–19.
- Kim, B.-H., H.-J. Kim, M.-S. Hyun und D.-H. Park. (1999). Direct Electrode Reaction of Fe(III)-Reducing Bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**:127–131.
- 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–e00917.
- 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., R. Wurst, D. Rehnlund und J. Gescher. (2024). Elucidating the development of cooperative anode-biofilm-structures. *Biofilm*. **7**:100193.
- Klein, M. I., K. M. Scott-Anne, S. Gregoire, P. L. Rosalen und H. Koo. (2012). Molecular approaches for viable bacterial population and transcriptional analyses in a rodent model of dental caries. *Molecular oral microbiology*. **27**:350–361.
- Koch, C. und F. Harnisch. (2016). Is there a Specific Ecological Niche for Electroactive Microorganisms? *ChemElectroChem*. **3**:1282–1295.
- Kotloski, N. J. und J. A. Gralnick. (2013). Flavin Electron Shuttles Dominate Extracellular Electron Transfer by *Shewanella oneidensis*. *mBio*. **4**:553–565.
- Kouzuma, A., X. Y. Meng, N. Kimura, K. Hashimoto und K. Watanabe. (2010). Disruption of the putative cell surface polysaccharide biosynthesis gene SO3177 in *Shewanella oneidensis* MR-1 enhances adhesion to electrodes and current generation in microbial fuel cells. *Applied and Environmental Microbiology*. **76**:4151–4157.
- Leang, C., X. Qian, T. Mester und D. R. Lovley. (2010). Alignment of the *c*-type cytochrome OmcS along pili of *Geobacter sulfurreducens*. *Applied and Environmental Microbiology*. **76**:4080–4084.
- Lee, K. J., J. A. Kim, W. Hwang, S. J. Park und K. H. Lee. (2013). Role of capsular polysaccharide (CPS) in biofilm formation and regulation of CPS production by quorum-sensing in *Vibrio vulnificus*. *Molecular Microbiology*. **90**:841–857.
- Levar, C. E., C. H. Chan, M. G. Mehta-Kolte und D. R. Bond. (2014). An inner membrane cytochrome required only for reduction of high redox potential extracellular electron acceptors. *mBio*. **5**:02034–14.
- Li, F., Z. Zheng, B. Yang, X. Zhang, Z. Li und L. Lei. (2016). A laminar-flow based microfluidic microbial three-electrode cell for biosensing. *Electrochimica Acta*. **199**:45–50.

- Li, F., R. Tang, B. Zhang, C. Qiao, H. Yu, Q. Liu, J. Zhang, L. Shi und H. Song. (2023). Systematic Full-Cycle Engineering Microbial Biofilms to Boost Electricity Production in *Shewanella oneidensis*. *Research*. **6**:0081.
- Liang, Y., H. Gao, J. Chen, Y. Dong, L. Wu, Z. He, X. Liu, G. Qiu und J. Zhou. (2010). Pellicle formation in *Shewanella oneidensis*. *BMC Microbiology*. **10**:1–11.
- Light, S. H., L. Su, R. Rivera-Lugo, J. A. Cornejo, A. Louie, A. T. Iavarone, C. M. Ajo-Franklin und D. A. Portnoy. (2018). A flavin-based extracellular electron transfer mechanism in diverse Gram-positive bacteria. *Nature*. **562**:140–144.
- 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.
- Liu, X., S. Zhuo, C. Rensing und S. Zhou. (2018). Syntrophic growth with direct interspecies electron transfer between pili-free *Geobacter* species. *The ISME Journal*. **12**:2142–2151.
- Liu, X., D. E. Holmes, D. J. Walker, Y. Li, D. Meier, S. Pinches, T. L. Woodard und J. A. Smith. (2022). Cytochrome OmcS Is Not Essential for Extracellular Electron Transport via Conductive Pili in *Geobacter sulfurreducens* Strain KN400. *Applied and Environmental Microbiology*. **88**:01622–21.
- Lloyd, J. R., C. Leang, A. L. Hodges Myerson, M. V. Coppi, S. Cuifo, B. Methe, S. J. Sandler und D. R. Lovley. (2003). Biochemical and genetic characterization of PpcA, a periplasmic *c*-type cytochrome in *Geobacter sulfurreducens*. *The 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., R. Rossi, A. Ragab und P. E. Saikaly. (2019). Electroactive microorganisms in bioelectrochemical systems. *Nature Reviews Microbiology*. **17**:307–319.
- Lovley, D. R. (2006). Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*. **4**:497–508.
- Lovley, D. R. (2008). The microbe electric: conversion of organic matter to electricity. *Current Opinion in Biotechnology*. **19**:564–571.
- Lovley, D. R. (2012). Electromicrobiology. *Annual Review of Microbiology*. **66**:391–409.
- Lovley, D. R. (2012). Long-range electron transport to Fe(III) oxide via pili with metallic-like conductivity. *Biochemical Society transactions*. **40**:1186–1190.
- Lovley, D. R. (2017). Happy together: microbial communities that hook up to swap electrons. *The ISME Journal*. **11**:327–336.
- Lovley, D. R. (2017). Syntrophy Goes Electric: Direct Interspecies Electron Transfer. *Annual review of microbiology*. **71**:643–664.
- Lovley, D. R. (2023). Response to Wang et al.: evidence contradicting the cytochrome-only model. *Trends in Microbiology*. **31**:548–549.
- 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. Akhujkar, 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.
- Lovley, D. R. und D. J. Walker. (2019). *Geobacter* Protein Nanowires. *Frontiers in Microbiology*. **10**:2078.
- Lovley, D. R. und J. Yao. (2021). Intrinsically Conductive Microbial Nanowires for 'Green' Electronics with Novel Functions. *Trends in biotechnology*. **39**:940–952.

- Lutz, R. und H. Bujard. (1997). Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. *Nucleic Acids Research*. **25**:1203.
- Macosko, C. W. (1994). *Rheology: Principles, Measurements, and Applications*: Academic Press.
- Mai, Q., G. Yang, J. Cao, X. Zhang und L. Zhuang. (2020). Stratified microbial structure and activity within anode biofilm during electrochemically assisted brewery wastewater treatment. *Biotechnology and Bioengineering*. **117**:2023–2031.
- Malvankar, N. S., J. Lau, K. P. Nevin, A. E. Franks, M. T. Tuominen und D. R. Lovley. (2012). Electrical conductivity in a mixed-species biofilm. *Applied and Environmental Microbiology*. **78**:5967–5971.
- Malvankar, N. S. und D. R. Lovley. (2014). Microbial nanowires for bioenergy applications. *Current Opinion in Biotechnology*. **27**:88–95.
- Malvankar, N. S., M. T. Tuominen und D. R. Lovley. (2012). Biofilm conductivity is a decisive variable for high-current-density *Geobacter sulfurreducens* microbial fuel cells. *Energy & Environmental Science*. **5**:5790–5797.
- 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.
- Malvankar, N. S., M. Vargas, K. Nevin, P. L. Tremblay, K. Evans-Lutterodt, D. Nykypanchuk, E. Martz, M. T. Tuomine und D. R. Lovley. (2015). Structural Basis for Metallic-Like Conductivity in Microbial Nanowires. *mBio*. **6**:00084–15.
- Malvankar, N. S., M. Vargas, K. P. Nevin, A. E. Franks, C. Leang, B. C. Kim, K. Inoue, T. Mester, S. F. Covalla, J. P. Johnson, V. M. Rotello, M. T. Tuominen und D. R. Lovley. (2011). Tunable metallic-like conductivity in microbial nanowire networks. *Nature Nanotechnology*. **6**:573–579.

- Malvankar, S., M. T. Tuominen, D. R. Lovley, S. M. Strycharz-Glaven und L. M. Tender. (2012). Reply to the ‘Comment on “On electrical conductivity of microbial nanowires and biofilms”’ by N. S. Malvankar, M. T. Tuominen and D. R. Lovley, *Energy Environ. Sci.*, 2012, 5, DOI: 10.1039/c2ee02613a. *Energy & Environmental Science*. **5**:6250–6255.
- Marsili, E., D. B. Baron, I. D. Shikhare, D. Coursolle, J. A. Gralnick und D. R. Bond. (2008). *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **105**:3968–3973.
- Marsili, E., J. Sun und D. R. Bond. (2010). Voltammetry and Growth Physiology of *Geobacter sulfurreducens* Biofilms as a Function of Growth Stage and Imposed Electrode Potential. *Electroanalysis*. **22**:865–874.
- Merah-Mourah, F., S. O. Cohen und A. Haziot. (2021). A Two-Stage Flow Cytometry Strategy to Distinguish Single Cells from Doublets in Heterogeneous Cell Mixtures and Improve Cell Cluster Identification: Application to Human Monocyte Subpopulations. *Current Protocols*. **1**:e229.
- Meshulam-Simon, G., S. Behrens, A. D. Choo und A. M. Spormann. (2007). Hydrogen metabolism in *Shewanella oneidensis* MR-1. *Applied and Environmental Microbiology*. **73**:1153–1165.
- 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.
- Mukherjee, M., N. Zaiden, A. Teng, Y. Hu und B. Cao. (2020). *Shewanella* biofilm development and engineering for environmental and bioenergy applications. *Current Opinion in Chemical Biology*. **59**:84–92.
- Nealson, K. H. und J. Scott. (2006). Ecophysiology of the Genus *Shewanella*. In: Dworkin, M., S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer und E. Stackebrandt *The*

- Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass* (S. 1133–1151): Springer New York, NY.
- Nevin, K. P., H. Richter, S. F. Covalla, J. P. Johnson, T. L. Woodard, A. L. Orloff, H. Jia, M. Zhang und D. R. Lovley. (2008). Power output and columbic efficiencies from biofilms of *Geobacter sulfurreducens* comparable to mixed community microbial fuel cells. *Environmental Microbiology*. **10**:2505–2514.
- Nevin, K. P., B. C. Kim, R. H. Glaven, J. P. Johnson, T. L. Woodward, B. A. Methé, R. J. Didonato, S. F. Covalla, A. E. Franks, A. Liu und D. R. Lovley. (2009). Anode Biofilm Transcriptomics Reveals Outer Surface Components Essential for High Density Current Production in *Geobacter sulfurreducens* Fuel Cells. *PLOS ONE*. **4**:e5628.
- Ng, C. K., J. Xu, Z. Cai, L. Yang, I. P. Thompson, W. E. Huang und B. Cao. (2020). Elevated intracellular cyclic-di-GMP level in *Shewanella oneidensis* increases expression of *c*-type cytochromes. *Microbial Biotechnology*. **13**:1904–1916.
- 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 & Environmental Science*. **7**:1357–1361.
- Otero, F. J., G. L. Chadwick, M. D. Yates, R. L. Mickol, S. H. Saunders, S. M. Glaven, J. A. Galnick, D. K. Newman, L. M. Tender, V. J. Orphan und D. R. Bond. (2021). Evidence of a Streamlined Extracellular Electron Transfer Pathway from

- Biofilm Structure, Metabolic Stratification, and Long-Range Electron Transfer Parameters. *Applied and Environmental Microbiology*. **87**:e00706–21.
- 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.
- Park, N. Y., J. H. Lee, M. W. Kim, H. G. Jeong, B. C. Lee, T. S. Kim und S. H. Choi. (2006). Identification of the *Vibrio vulnificus wbpP* Gene and Evaluation of Its Role in Virulence. *Infection and Immunity*. **74**:721.
- Parkhey, P. und R. Sahu. (2021). Microfluidic microbial fuel cells: Recent advancements and future prospects. *International Journal of Hydrogen Energy*. **46**:3105–3123.
- Parrilli, E., M. L. Tutino und G. Marino. (2022). Biofilm as an adaptation strategy to extreme conditions. *Rendiconti Lincei*. **33**:527–536.
- Peng, N., P. Cai, M. Mortimer, Y. Wu, C. Gao und Q. Huang. (2020). The exopolysaccharide–eDNA interaction modulates 3D architecture of *Bacillus subtilis* biofilm. *BMC Microbiology*. **20**:115.
- Pérez-Rodríguez, S., J. M. García-Aznar und J. Gonzalo-Asensio. (2022). Microfluidic devices for studying bacterial taxis, drug testing and biofilm formation. *Microbial Biotechnology*. **15**:395–414.
- Petrova, O. E. und K. Sauer. (2016). Escaping the biofilm in more than one way: Desorption, detachment or dispersion. *Current opinion in microbiology*. **30**:67.
- Pillot, G., E. Frouin, E. Pasero, A. Godfroy, Y. Combet-Blanc, S. Davidson und P. P. Liebgott. (2018). Specific enrichment of hyperthermophilic electroactive Archaea from deep-sea hydrothermal vent on electrically conductive support. *Bioresource technology*. **259**:304–311.

- Pinchuk, G. E., O. V. Geydebrekht, E. A. Hill, J. L. Reed, A. E. Konopka, A. S. Beliaev und J. K. Fredrickson. (2011). Pyruvate and Lactate Metabolism by *Shewanella oneidensis* MR-1 under Fermentation, Oxygen Limitation, and Fumarate Respiration Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. **77**:8234.
- Pinck, S., L. M. Ostorumujof, S. Teychené und B. Erable. (2020). Microfluidic Microbial Bioelectrochemical Systems: An Integrated Investigation Platform for a More Fundamental Understanding of Electroactive Bacterial Biofilms. *Microorganisms*. **8**:1841.
- Raad, I., H. Hanna, T. Dvorak, G. Chaiban und R. Hachem. (2007). Optimal Antimicrobial Catheter Lock Solution, Using Different Combinations of Minocycline, EDTA, and 25-Percent Ethanol, Rapidly Eradicates Organisms Embedded in Biofilm. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **51**:78.
- Raghavulu, S. V., R. K. Goud, P. N. Sarma und S. V. Mohan. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* as anodic biocatalyst for power generation in biofuel cell: Influence of redox condition and substrate load. *Bioresource Technology*. **102**:2751–2757.
- Ray, V. A., A. R. Morris und K. L. Visick. (2012). A Semi-quantitative Approach to Assess Biofilm Formation Using Wrinkled Colony Development. *Journal of Visualized Experiments*. **7**:e4035.
- Reguera, G. (2018). Harnessing the power of microbial nanowires. *Microbial Biotechnology*. **11**:979–994.
- 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.

- Renslow, R. S., J. T. Babauta, A. C. Dohnalkova, M. I. Boyanov, K. M. Kemner, P. D. Majors, J. K. Fredrickson und H. Beyenal. (2013). Metabolic spatial variability in electrode-respiring *Geobacter sulfurreducens* biofilms. *Energy & Environmental Science*. **6**:1827–1836.
- Richter, H., M. Lanthier, K. P. Nevin und D. R. Lovley. (2007). Lack of electricity production by *Pelobacter carbinolicus* indicates that the capacity for Fe(III) oxide reduction does not necessarily confer electron transfer ability to fuel cell anodes. *Applied and Environmental Microbiology*. **73**:5347–5353.
- Richter, H., K. P. Nevin, H. Jia, D. A. Lowy, D. R. Lovley und L. M. Tender. (2009). Cyclic voltammetry of biofilms of wild type and mutant *Geobacter sulfurreducens* on fuel cell anodes indicates possible roles of OmcB, OmcZ, type IV pili, and protons in extracellular electron transfer. *Energy & Environmental Science*. **2**:506–516.
- Rollefson, J. B., C. S. Stephen, M. Tien und D. R. Bond. (2011). Identification of an Extracellular Polysaccharide Network Essential for Cytochrome Anchoring and Biofilm Formation in *Geobacter sulfurreducens*. *Journal of Bacteriology*. **193**:1023.
- Rosenbaum, M. A., H. Y. Bar, Q. K. Beg, D. Segrè, J. Booth, M. A. Cotta und L. T. Angenent. (2012). Transcriptional Analysis of *Shewanella oneidensis* MR-1 with an Electrode Compared to Fe(III)Citrate or Oxygen as Terminal Electron Acceptor. *PLOS ONE*. **7**:e30827.
- Ross, D. E., S. S. Ruebush, S. L. Brantley, R. S. Hartshorne, T. A. Clarke, D. J. Richardson und M. Tien. (2007). Characterization of Protein-Protein Interactions Involved in Iron Reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Applied and Environmental Microbiology*. **73**:5797.
- Ruhal, R. und R. Kataria. (2021). Biofilm patterns in gram-positive and gram-negative bacteria. *Microbiological Research*. **251**:126829.
- Rumbaugh, K. P. und K. Sauer. (2020). Biofilm dispersion. *Nature reviews. Microbiology*. **18**:571.

- Sanger, F., S. Nicklen und A. R. Coulson. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **74**:5463.
- Santoro, C., C. Arbizzani, B. Erable und I. Ieropoulos. (2017). Microbial fuel cells: From fundamentals to applications. A review. *Journal of Power Sources*. **356**:225–244.
- 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.
- 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.
- Schmid, F., J. Novion Ducassou, Y. Couté und J. Gescher. (2021). Developing *Rhodobacter sphaeroides* for cathodic biopolymer production. *Bioresource Technology*. **336**:125340.
- Schrott, G. D., P. S. Bonanni, L. Robuschi, A. Esteve-Nuñez und J. P. Busalmen. (2011). Electrochemical insight into the mechanism of electron transport in biofilms of *Geobacter sulfurreducens*. *Electrochimica Acta*. **56**:10791–10795.
- Shi, D., G. Mi, M. Wang und T. J. Webster. (2019). *In vitro* and *ex vivo* systems at the forefront of infection modeling and drug discovery. *Biomaterials*. **198**:228.
- Silva, A. V., M. Edel, J. Gescher und C. M. Paquete. (2020). Exploring the Effects of *bolA* in Biofilm Formation and Current Generation by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Frontiers in Microbiology*. **11**:520772.
- Simonte, F., G. Sturm, J. Gescher und K. Sturm-Richter. (2019). Extracellular electron transfer and biosensors. In: Harnisch, F. und D. Holtman *Bioelectrosynthesis* (S. 15–38): Springer Nature Switzerland AG.

- Steidl, R. J., S. Lampa-Pastirk und G. Reguera. (2016). Mechanistic stratification in electroactive biofilms of *Geobacter sulfurreducens* mediated by pilus nanowires. *Nature Communications*. **7**:12217.
- Steinmetz, M., D. Le Coq, H. B. Djemia und P. Gay. (1983). Analyse génétique de *sacB*, gène de structure d'une enzyme secrétée, la lévane-saccharase de *Bacillus subtilis* Marburg. *MGG Molecular & General Genetics*. **191**:138–144.
- Stewart, P. S. (2003). Diffusion in Biofilms. *Journal of Bacteriology*. **185**:1485.
- Stoodley, P., K. Sauer, D. G. Davies und J. W. Costerton. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual review of microbiology*. **56**:187–209.
- Strycharz-Glaven, S. M., R. M. Snider, A. Guiseppi-Elie, N. S. Malvankar, M. T. Tuominen und D. R. Lovley. (2012). Comment on “On electrical conductivity of microbial nanowires and biofilms” by S. M. Strycharz-Glaven, R. M. Snider, A. Guiseppi-Elie and L. M. Tender, *Energy Environ. Sci.*, 2011, 4, 4366. *Energy & Environmental Science*. **5**:6247–6249.
- 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 & 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. *The ISME Journal*. **9**:1802.
- Summers, Z. M., T. Ueki, W. Ismail, S. A. Haveman und D. R. Lovley. (2012). Laboratory evolution of *Geobacter sulfurreducens* for enhanced growth on lactate via a single-base-pair substitution in a transcriptional regulator. *The ISME journal*. **6**:975–983.
- Sun, D., J. Chen, H. Huang, W. Liu, Y. Ye und S. Cheng. (2016). The effect of biofilm thickness on electrochemical activity of *Geobacter sulfurreducens*. *International Journal of Hydrogen Energy*. **41**:16523–16528.

- Sun, D., S. Cheng, F. Zhang und B. E. Logan. (2017). Current density reversibly alters metabolic spatial structure of exoelectrogenic anode biofilms. *Journal of Power Sources*. **356**:566–571.
- Sutherland, I. W. (2017). EPS – a complex mixture. In: Flemming, H.-C., T. R. Neu und J. Wingender *The Perfect Slime: Microbial Extracellular Polymeric Substances (EPS)* (S. 15–24): IWA Publishing.
- Tepavčević, J., K. Yarrington, B. Fung, X. Lin und K. L. Visick. (2022). sRNA chaperone Hfq controls bioluminescence and other phenotypes through Qrr1-dependent and -independent mechanisms in *Vibrio fischeri*. *Gene*. **809**:146048.
- Theunissen, S., L. De Smet, A. Dansercoer, B. Motte, T. Coenye, J. J. Van Beeumen, B. Devreese, S. N. Savvides und B. Vergauwen. (2010). The 285 kDa Bap/RTX hybrid cell surface protein (SO4317) of *Shewanella oneidensis* MR-1 is a key mediator of biofilm formation. *Research in Microbiology*. **161**:144–152.
- Theunissen, S., B. Vergauwen, L. De Smet, J. Van Beeumen, P. Van Gelder und S. N. Savvides. (2009). The agglutination protein AggA from *Shewanella oneidensis* MR-1 is a TolC-like protein and forms active channels *in vitro*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **386**:380–385.
- Thormann, K. M., S. Duttler, R. M. Saville, M. Hyodo, S. Shukla, Y. Hayakawa und A. M. Spormann. (2006). Control of formation and cellular detachment from *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms by cyclic di-GMP. *Journal of bacteriology*. **188**:2681–2691.
- Thormann, K. M., R. M. Saville, S. Shukla, D. A. Pelletier und A. M. Spormann. (2004). Initial Phases of Biofilm Formation in *Shewanella oneidensis* MR-1. *Journal of Bacteriology*. **186**:8096.
- Thormann, K. M., R. M. Saville, S. Shukla und A. M. Spormann. (2005). Induction of Rapid Detachment in *Shewanella oneidensis* MR-1 Biofilms. *Journal of Bacteriology*. **187**:1014.

- Tiedje, J. M. (2002). *Shewanella*—the environmentally versatile genome. *Nature Biotechnology* 2002 20:11. **20**:1093–1094.
- 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.
- Ucar, D., Y. Zhang und I. Angelidaki. (2017). An Overview of Electron Acceptors in Microbial Fuel Cells. *Frontiers in Microbiology*. **8**:643.
- Vandana und S. Das. (2022). Genetic regulation, biosynthesis and applications of extracellular polysaccharides of the biofilm matrix of bacteria. *Carbohydrate Polymers*. **291**:119536.
- 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. Nealson. (1999). Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. *International journal of systematic bacteriology*. **49**:705–724.
- Vert, M., Y. Doi, K.-H. Hellwich, M. Hess, P. Hodge, P. Kubisa, M. Rinaudo und F. Schué. (2012). Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure and Applied Chemistry*. **84**:377–410.
- Von Canstein, H., J. Ogawa, S. Shimizu und J. R. Lloyd. (2008). Secretion of flavins by *Shewanella* species and their role in extracellular electron transfer. *Applied and Environmental Microbiology*. **74**:615–623.
- Wagner, M. und H. Horn. (2017). Optical coherence tomography in biofilm research: A comprehensive review. *Biotechnology and Bioengineering*. **114**:1386–1402.
- Wagner, M., D. Taherzadeh, C. Haisch und H. Horn. (2010). Investigation of the mesoscale structure and volumetric features of biofilms using optical coherence tomography. *Biotechnology and Bioengineering*. **107**:844–853.

- Wang, F., Y. Gu, J. P. O'Brien, S. M. Yi, S. E. Yalcin, V. Srikanth, C. Shen, D. Vu, N. L. Ing, A. I. Hochbaum, E. H. Egelman und N. S. Malvankar. (2019). Structure of Microbial Nanowires Reveals Stacked Hemes that Transport Electrons over Micrometers. *Cell*. **177**:361.
- Wille, J. und T. Coenye. (2020). Biofilm dispersion: The key to biofilm eradication or opening Pandora's box? *Biofilm*. **2**:100027.
- Wu, C., Y. Y. Cheng, H. Yin, X. N. Song, W. W. Li, X. X. Zhou, L. P. Zhao, L. J. Tian, J. C. Han und H. Q. Yu. (2013). Oxygen promotes biofilm formation of *Shewanella putrefaciens* CN32 through a diguanylate cyclase and an adhesin. *Scientific Reports*. **3**:1945.
- 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.
- Yahyanezhad Gele, M., A. S. Sadat Kachooei, S. Yaghmaei und M. M. Mardanpour. (2023). Developing a self-powered microfluidic microbial electrolysis cell (MEC) for converting oxalate into hydrogen. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. **11**:109373.
- Yalcin, S. E. und N. S. Malvankar. (2020). The blind men and the filament: Understanding structures and functions of microbial nanowires. *Current Opinion in Chemical Biology*. **59**:193–201.
- Yang, G., Q. Mai, Z. Zhuang und L. Zhuang. (2021). Buffer capacity regulates the stratification of anode-respiring biofilm during brewery wastewater treatment. *Environmental Research*. **201**:111572.
- Yilmazel, Y. D., X. Zhu, K. Y. Kim, D. E. Holmes und B. E. Logan. (2018). Electrical current generation in microbial electrolysis cells by hyperthermophilic archaea *Ferroglobus placidus* and *Geoglobus ahangari*. *Bioelectrochemistry*. **119**:142–149.

- 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.
- 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.
- Zarabadi, M. P., S. J. Charette und J. Greener. (2018). Flow-Based Deacidification of *Geobacter sulfurreducens* Biofilms Depends on Nutrient Conditions: a Microfluidic Bioelectrochemical Study. *ChemElectroChem*. **5**:3645–3653.
- Zhang, Y., C. K. Ng, Y. Cohen und B. Cao. (2014). Cell growth and protein expression of *Shewanella oneidensis* in biofilms and hydrogel-entrapped cultures. *Molecular BioSystems*. **10**:1035–1042.
- Zhou, G., J. Yuan und H. Gao. (2015). Regulation of biofilm formation by BpfA, BpfD, and BpfG in *Shewanella oneidensis*. *Frontiers in Microbiology*. **6**:790.

Anhang

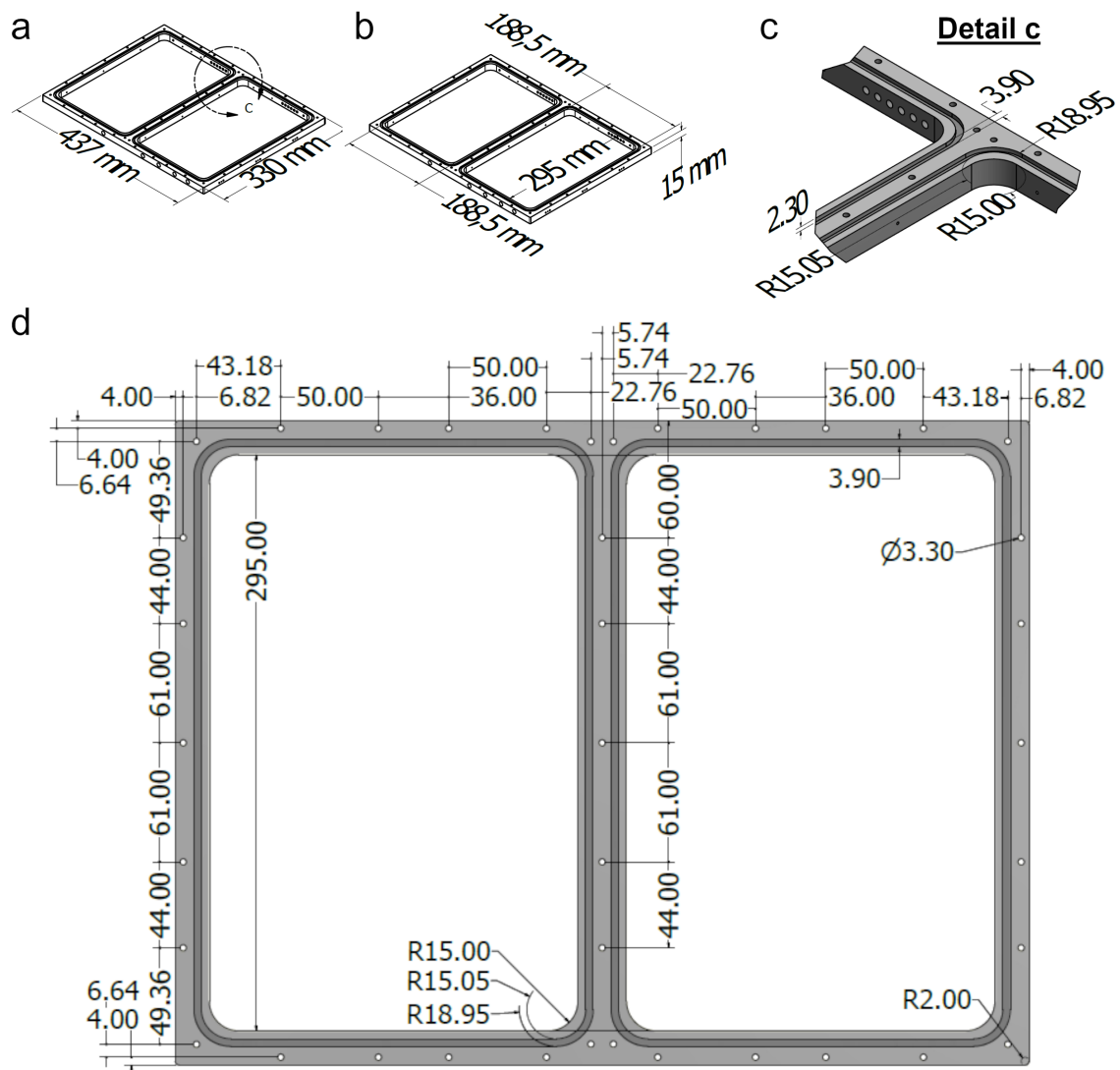


Abb. A1: **Technische Zeichnungen des Rahmens zur Kultivierung von mikrofluidischen Fließzellen.** Jede Versuchskammer (siehe auch Abb. 9) besteht aus einem Rahmen, einer Bodenplatte (Abb. A6) und einer Deckelplatte (Abb. A5). In **a** und **b** sind die Maße des aus Polycarbonat bestehenden Rahmens aufgeführt. In **c** ist ein detaillierter Ausschnitt relevanter Radien sowie die Maße der Nut dargestellt und in **d** sind die Abstände der Durchgangsbohrungen aufgeführt. Alle Maße sind in mm angegeben.

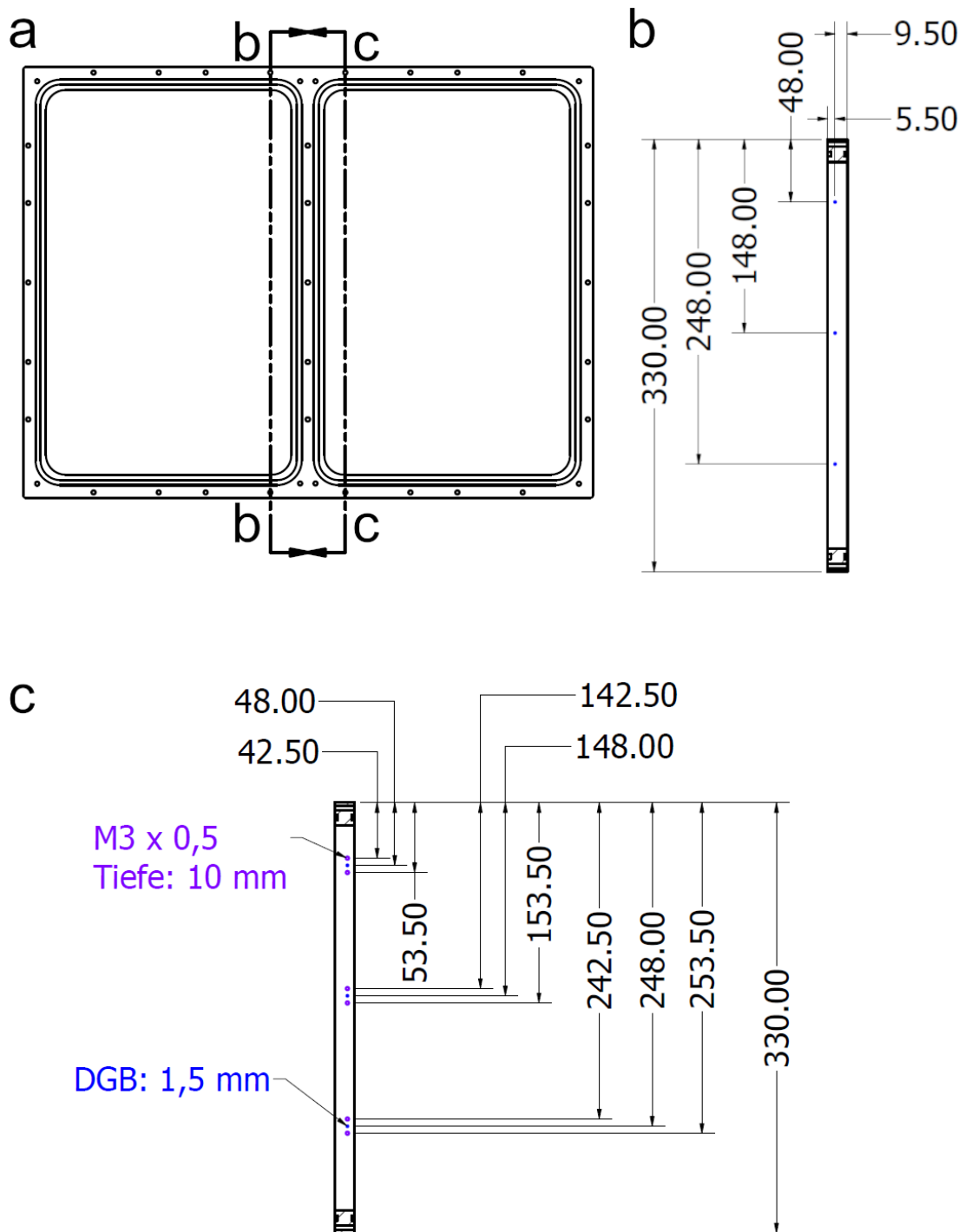


Abb. A2: Technische Zeichnung des Mittelstegs des Rahmens zur Kultivierung von mikrofluidischen Fließzellen (siehe auch Abb A1). In a ist der Rahmen von oben zu sehen und es sind zwei Abschnitte markiert, welche in b und c detailliert dargestellt sind. Bei blau markierten Bohrungen handelt es sich um Durchgangsbohrungen (DGB). Lila markierte Bohrungen entsprechen M3 x 0,5 mit einer Tiefe von 10 mm. Alle Maße sind in mm angegeben.

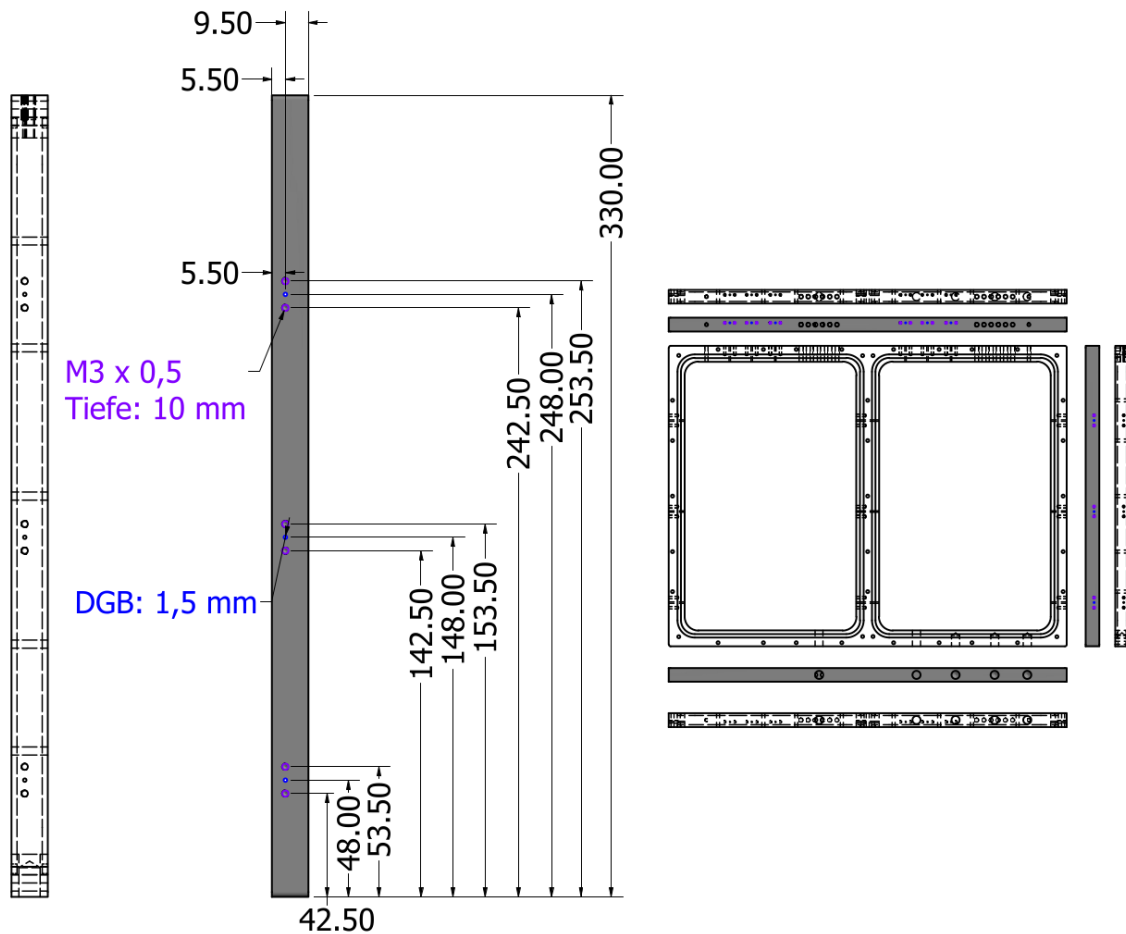


Abb. A3: Technische Zeichnung der kurzen Seite des Rahmens zur Kultivierung von mikrofluidischen Fließzellen (siehe auch Abb A1). Die kurzen Seiten des Kultivierungsrahmens sind identisch, weshalb nur eine der Seiten detailliert dargestellt ist. Bei blau markierten Bohrungen handelt es sich um Durchgangsbohrungen (DGB). Lila markierte Bohrungen entsprechen M3 x 0,5 mit einer Tiefe von 10 mm. Alle Maße sind in mm angegeben.

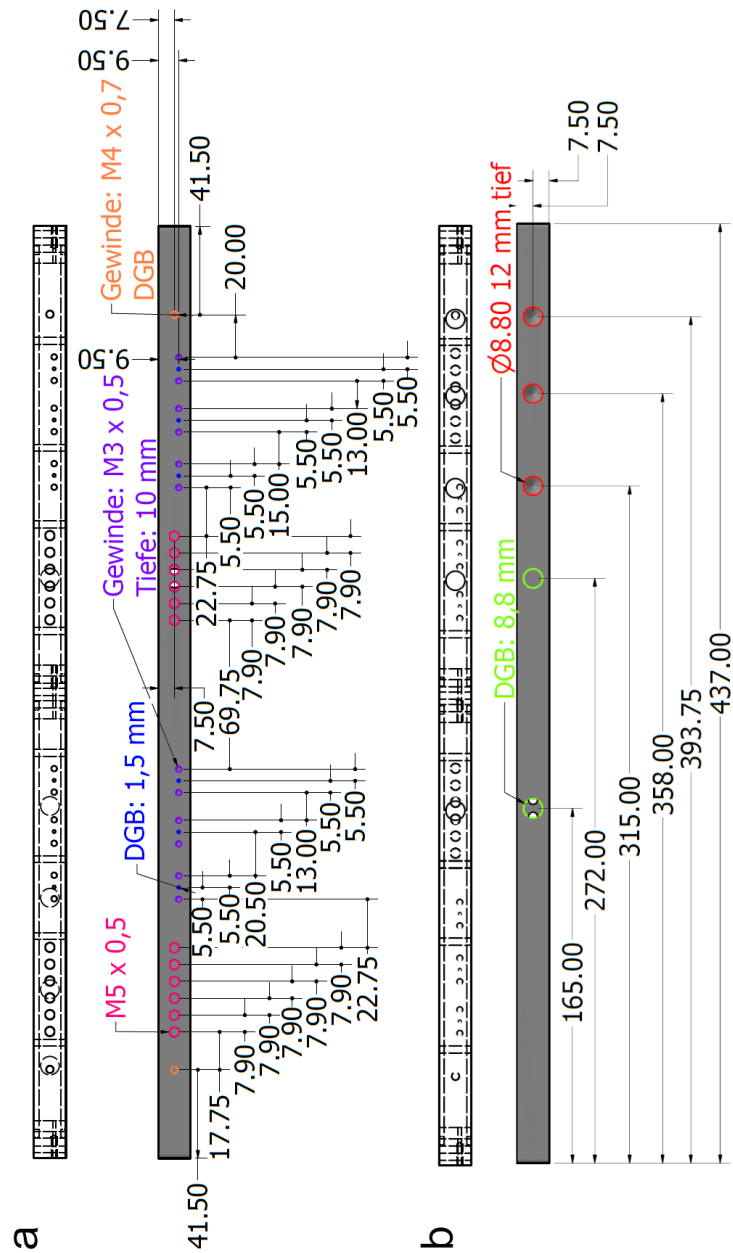


Abb. A4: Technische Zeichnung der langen Seiten des Rahmens zur Kultivierung von mikrofluidischen Fließzellen (siehe auch Abb A1). Die langen Seiten des Kultivier Rahmens sind nicht identisch, weshalb beide im Detail in **a** und **b** dargestellt sind. In die pink markierten Bohrungen werden Miniatur-Laborbuchsen (MBI 1, d = 2 mm; SKS Hirschmann, Nürnberg) eingesetzt, welche eine elektrische Konnektierung mittels Bananensteckern ermöglichen. Durch die blau markierten Durchgangsbohrungen (DGB) können Kanülen mit einem Außendurchmesser von 1,2 mm eingesetzt werden, welche z. B. für eine Inokulation verwendet werden können. Damit trotz eingesetzter Kanülen eine möglichst sauerstofffreie Kultivierung möglich ist, kann eine Dichtung über die lilafarbenen Bohrungen eingeschraubt werden. In die orangefarbenen Bohrungen können Gasanschlüsse eingeschraubt werden. Alle Maße sind in mm angegeben.

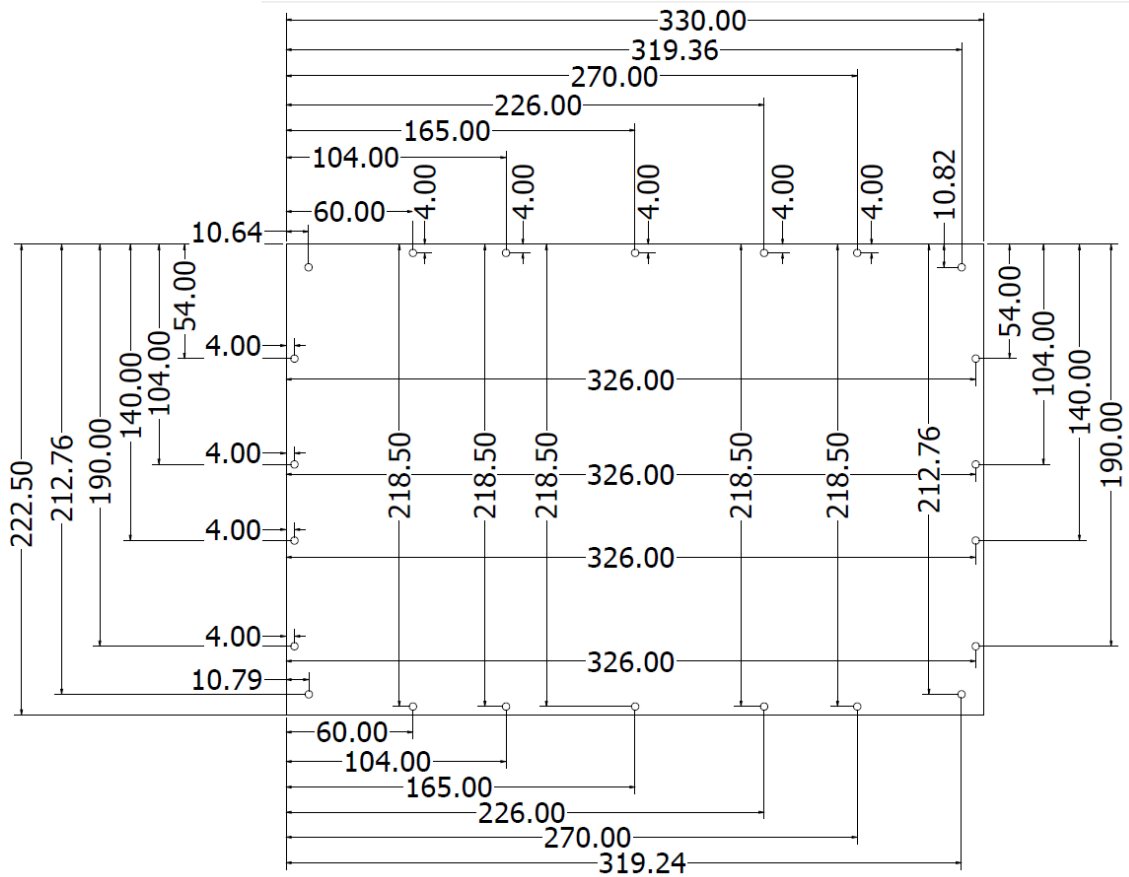


Abb. A5: **Technische Zeichnung der Deckelplatte, welche Teil der Versuchskammer zur Kultivierung von mikrofluidischen Fließzellen ist (siehe auch Abb A1).** Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Deckelplatten hatten eine Stärke von 3 mm und bestanden aus kratzfestem Polycarbonat. Es sind die Positionen der Durchgangslöcher ($d = 3,5$) in mm angegeben.

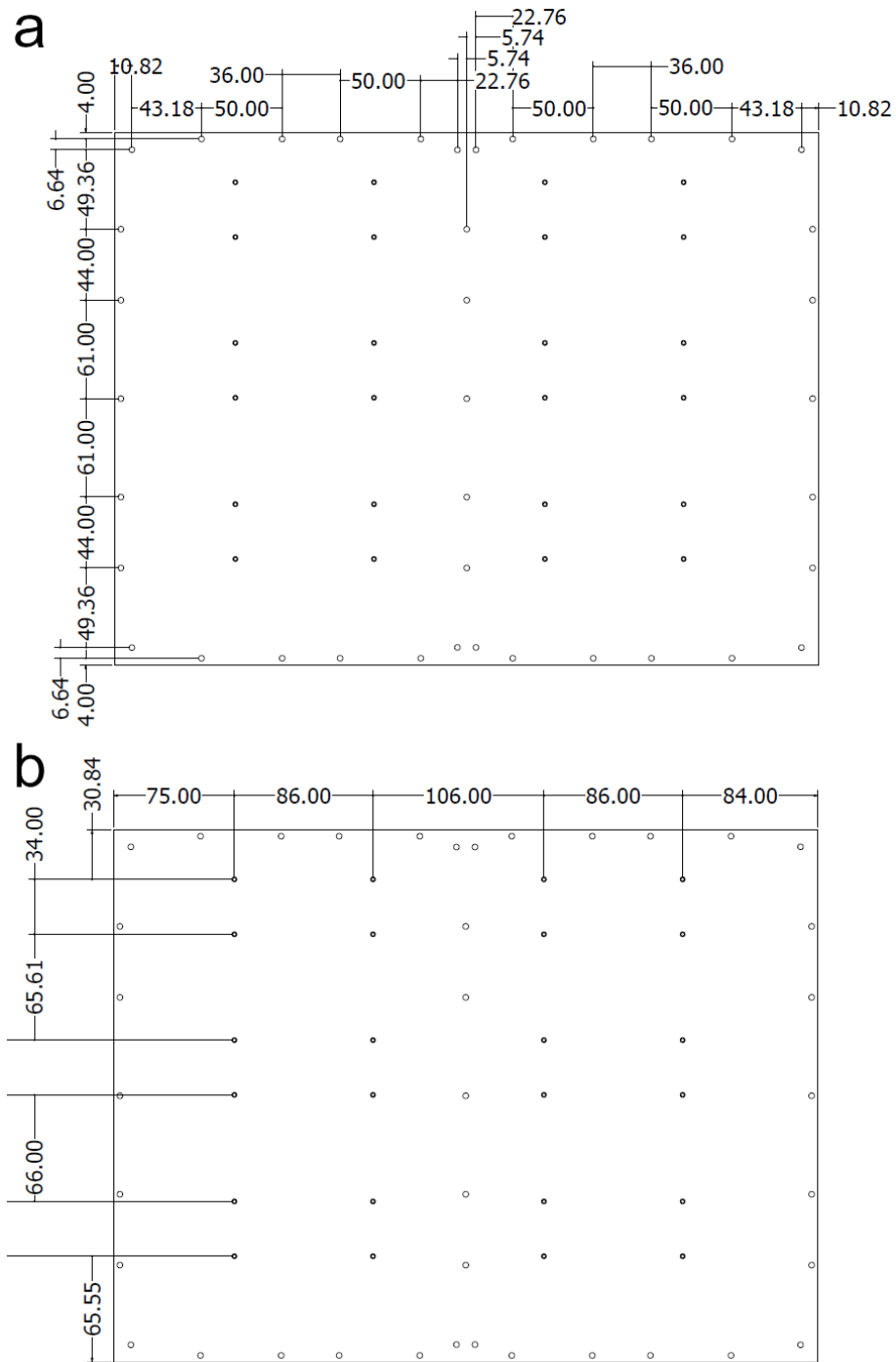


Abb. A6: **Technische Zeichnung der Bodenplatte, welche Teil der Versuchskammer zur Kultivierung von mikrofluidischen Fließzellen ist (siehe auch Abb A1).** Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bodenplatten hatten eine Stärke von 5 mm und bestanden aus Polycarbonat. In **a** sind die Positionen der Durchgangslöcher ($d = 3,5$) in mm angegeben und in **b** die Positionen der 3 mm tiefen M3 x 0,5-Löcher.

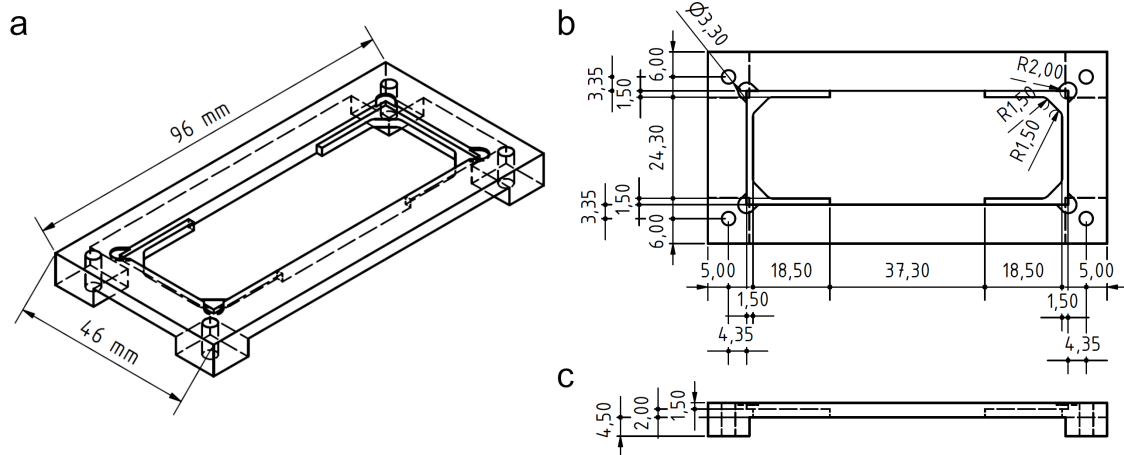


Abb. A7: Halterung zur Platzierung von mikrofluidischen Durchflussreaktoren. Die Halterungen können auf der Bodenplatten (Abb. A6) der Versuchskammer zur Kultivierung von mikrofluidischen Fließzellen platziert werden.

Tab. A1: Einfluss der Überexpression von *wbpA*, *wbpP* und *wbpAP* auf die Biofilmporosität unter anoxischen Bedingungen. Die Kultivierung erfolgte mit Laktat als Elektronendonator und Fumarat als Elektronenakzeptor. Die Biofilmporosität in % ist über die Zeit für vier verschiedene Stämme angegeben. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen aus unabhängigen Versuchen ($n = 3$). Eingefärbte Zellen zeigen signifikante Unterschiede zum Kontrollstamm mit dem leeren Plasmid an (ungepaarter t-Test: grün = $p < 0,01$; rot = $p < 0,05$). Die graphische Darstellung dieser Zahlen ist in Abb. 19 zu finden.

		20 h	26 h	35 h	43 h	50 h
JG1475	Kontrolle	10,4 ± 2,3	18,6 ± 0,3	30,8 ± 1,0	27,9 ± 4,8	22,5 ± 1,4
JG1861	<i>wbpA</i>	2,8 ± 2,3	13,2 ± 2,3	15,7 ± 4,9	22,0 ± 2,0	16,1 ± 1,4
JG1862	<i>wbpP</i>	11,6 ± 8,6	16,7 ± 19,9	35,3 ± 27,1	41,0 ± 6,3	23,6 ± 2,3
JG1863	<i>wbpAP</i>	1,9 ± 1,5	9,2 ± 3,6	6,9 ± 5,5	20,4 ± 4,3	15,6 ± 1,3

Tab. A2: Einfluss der Überexpression von *wbpA*, *wbpP* und *wbpAP* auf die Biofilmvolumen unter anoxischen Bedingungen. Die Kultivierung erfolgte mit Laktat als Elektronendonator und Fumarat als Elektronenakzeptor. Das Biofilmvolumen in $\text{mm}^3 \text{cm}^{-2}$ ist über die Zeit für vier verschiedene Stämme angegeben. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen aus unabhängigen Versuchen ($n = 3$). Eingefärbte Zellen zeigen signifikante Unterschiede zum Kontrollstamm mit dem leeren Plasmid an (ungepaarter t-Test: grün = $p < 0,01$; rot = $p < 0,05$). Die graphische Darstellung dieser Zahlen ist in Abb. 19 zu finden.

		20 h	26 h	35 h	43 h	50 h
JG1475	Kontrolle	0,9 ± 0,0	2,4 ± 0,3	9,4 ± 0,1	14,1 ± 2,7	17,2 ± 0,4
JG1861	<i>wbpA</i>	0,8 ± 0,1	1,4 ± 0,2	8,0 ± 1,5	11,2 ± 1,0	14,0 ± 0,9
JG1862	<i>wbpP</i>	0,2 ± 0,1	0,9 ± 0,6	3,8 ± 1,4	10,2 ± 2,0	13,8 ± 1,0
JG1863	<i>wbpAP</i>	1,1 ± 0,6	3,0 ± 1,5	8,4 ± 2,7	12,2 ± 1,1	14,5 ± 1,2

Tab. A3: **Einfluss der Überexpression von *wbpA*, *wbpP* und *wbpAP* unter anoxischen Bedingungen.** Die Kultivierung erfolgte mit Laktat als Elektronendonator und Fumarat als Elektronenakzeptor. Die Biofilmhöhe in μm ist über die Zeit für vier verschiedene Stämme angegeben. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen aus unabhängigen Versuchen ($n = 3$). Eingefärbte Zellen zeigen signifikante Unterschiede zum Kontrollstamm mit dem leeren Plasmid an (ungepaarter t-Test: grün = $p < 0,01$; rot = $p < 0,05$). Die graphische Darstellung dieser Zahlen ist in Abb. 19 zu finden.

		20 h	26 h	35 h	43 h	50 h
JG1475	Kontrolle	10,1 ± 0,5	29,1 ± 3,1	135,6 ± 3,7	194,5 ± 23,6	221,5 ± 3,2
JG1861	<i>wbpA</i>	8,1 ± 1,7	15,1 ± 2,6	94,0 ± 13,0	143,3 ± 9,6	166,7 ± 8,2
JG1862	<i>wbpP</i>	2,2 ± 1,2	10,9 ± 4,9	52,8 ± 22,6	151,1 ± 19,9	185,0 ± 13,3
JG1863	<i>wbpAP</i>	10,1 ± 6,1	30,1 ± 15,3	88,7 ± 24,1	157,2 ± 12,7	171,1 ± 13,1

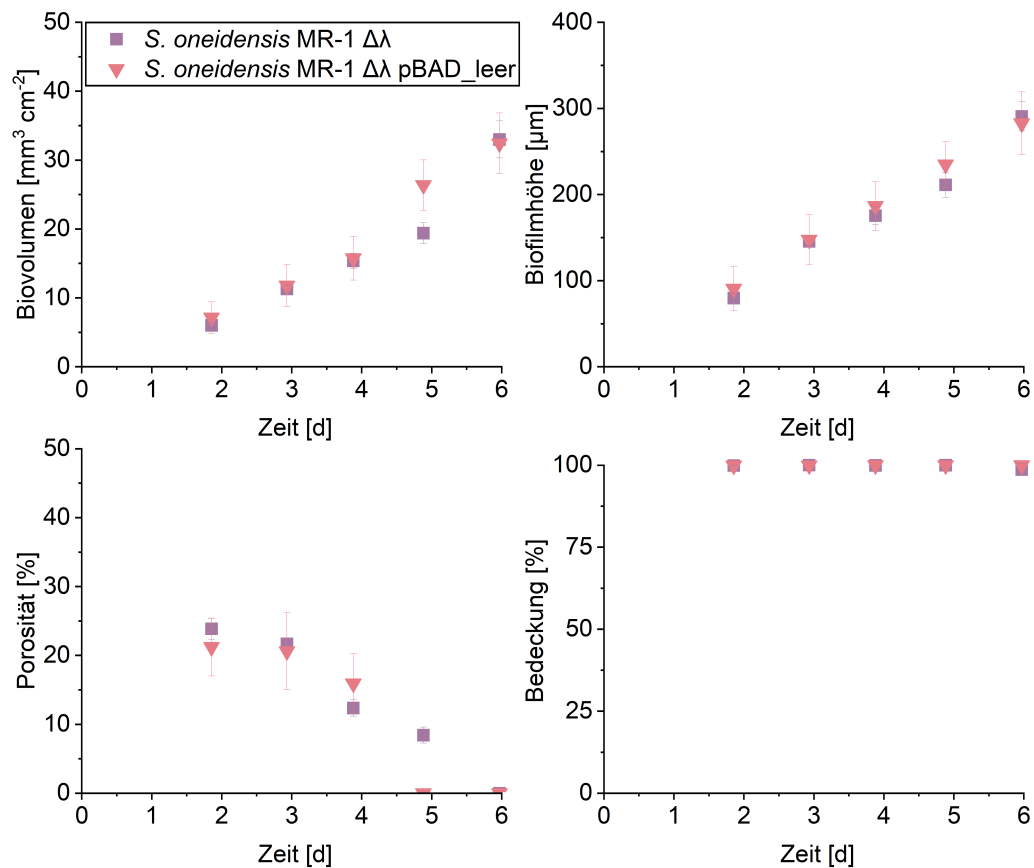


Abb. A8: **Einfluss eines leeren Plasmids auf die Biofilmbildung von *S. oneidensis* unter oxischen Bedingungen.** Die Biofilme wurden mit Laktat als Elektronendonator und atmosphärischem Sauerstoff als Elektronenakzeptor in mikrofluidischen Fließzellen kultiviert. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von unabhängigen Replikaten dar ($n = 3$). *S. oneidensis* MR-1 $\Delta\lambda$ = JG918 und *S. oneidensis* MR-1 $\Delta\lambda$ pBAD_leer = JG1475.

Tab. A4: **Einfluss von *bpfG* (C116S) sowie der Überexpression von *bpfA* und *aggA* auf das Biovolumen unter oxischen Bedingungen.** Die Kultivierung erfolgte mit Laktat als Elektronendonator und Luftsauerstoff als Elektronenakzeptor. Das Biovolumen in $\text{mm}^3 \text{cm}^{-2}$ ist über die Zeit für fünf verschiedene Stämme angegeben. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen aus unabhängigen Versuchen ($n = 3$). Eingefärbte Zellen zeigen signifikante Unterschiede zum Kontrollstamm mit dem leeren Plasmid an (ungepaarter t-Test: grün = $p < 0,01$; rot = $p < 0,05$). Ein Sternchen (*) bedeutet, dass zwei Reaktoren verblieben sind und **, dass ein Reaktor verblieben ist. Die graphische Darstellung dieser Zahlen ist in Abb. 22 und 23 zu finden.

		20 h	26 h	35 h	43 h	50 h
JG918	$\Delta\lambda$	$6,4 \pm 0,3$	$11,3 \pm 0,5$	$15,4 \pm 1,1$	$19,4 \pm 1,5$	$33,0 \pm 2,7$
JG1739	$\Delta\lambda$ <i>bpfA</i> (P_{cymA})	$7,4 \pm 2,5$	$13,2 \pm 2,3$	$19,1 \pm 1,4$	28,8**	39,7 **
JG1738	$\Delta\lambda$ <i>bpfG</i> (C116S)	1,8 ± 0,8	$9,2 \pm 3,8$	$15,8 \pm 3,2$	$18,5^* \pm 0,9$	
JG1475	$\Delta\lambda$ pBAD_leer	$7,1 \pm 2,3$	$11,8 \pm 3,1$	$15,7 \pm 3,2$	$26,4 \pm 3,6$	$32,4 \pm 4,4$
JG1758	$\Delta\lambda$ pBAD_ <i>aggA</i>	$7,2 \pm 1,1$	$12,1 \pm 2,6$	16,0 ± 1,2	$19,8 \pm 1,3$	$24,6 \pm 1,2$

Tab. A5: **Einfluss von *bpfG* (C116S) sowie der Überexpression von *bpfA* und *aggA* auf die Biofilmhöhe unter oxischen Bedingungen.** Die Kultivierung erfolgte mit Laktat als Elektronendonator und Luftsauerstoff als Elektronenakzeptor. Die Biofilmhöhe in μm ist über die Zeit für fünf verschiedene Stämme angegeben. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen aus unabhängigen Versuchen ($n = 3$). Eingefärbte Zellen zeigen signifikante Unterschiede zum Kontrollstamm mit dem leeren Plasmid an (ungepaarter t-Test: grün = $p < 0,01$; rot = $p < 0,05$). Ein Sternchen (*) bedeutet, dass zwei Reaktoren verblieben sind und **, dass ein Reaktor verblieben ist. Die graphische Darstellung dieser Zahlen ist in Abb. 22 und 23 zu finden.

		20 h	26 h	35 h	43 h	50 h
JG918	$\Delta\lambda$	$79,7 \pm 5,4$	$145,6 \pm 5,1$	$175,4 \pm 10,6$	$211,2 \pm 14,4$	$290,7 \pm 16,8$
JG1739	$\Delta\lambda$ <i>bpfA</i> (P_{cymA})	$94,1 \pm 41,4$	$168,0 \pm 15,7$	214,6 ± 8,6	261,2**	345,8**
JG1738	$\Delta\lambda$ <i>bpfG</i> (C116S)	27,0 ± 14,3	$124,8 \pm 37,7$	$185,1 \pm 27,7$	$197,7^* \pm 28,7$	
JG1475	$\Delta\lambda$ pBAD_leer	$90,6 \pm 25,5$	$147,6 \pm 29,0$	$186,7 \pm 28,3$	$234,9 \pm 26,5$	$282,7 \pm 36,5$
JG1758	$\Delta\lambda$ pBAD_ <i>aggA</i>	$82,3 \pm 11,0$	$133,3 \pm 25,3$	$182,1 \pm 14,0$	$210,6 \pm 14,0$	$257,4 \pm 12,3$

Tab. A6: Einfluss von *bpfG* (C116S) sowie der Überexpression von *bpfA* und *aggA* auf die Biofilmporosität unter oxischen Bedingungen. Die Kultivierung erfolgte mit Laktat als Elektronendonator und Luftsauerstoff als Elektronenakzeptor. Die Biofilmporosität in % ist über die Zeit für fünf verschiedene Stämme angegeben. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen aus unabhängigen Versuchen ($n = 3$). Eingefärbte Zellen zeigen signifikante Unterschiede zum Kontrollstamm mit dem leeren Plasmid an (ungepaarter t-Test: grün = $p < 0,01$; rot = $p < 0,05$). Ein Sternchen (*) bedeutet, dass zwei Reaktoren verblieben sind und **, dass ein Reaktor verblieben ist. Die graphische Darstellung dieser Zahlen ist in Abb. 22 und 23 zu finden.

		20 h	26 h	35 h	43 h	50 h
JG918	$\Delta\lambda$	$23,9 \pm 1,5$	$21,7 \pm 0,8$	$12,4 \pm 1,2$	$8,4 \pm 1,2$	$11,7 \pm 16,6$
JG1739	$\Delta\lambda$ <i>bpfA</i> (P_{cymA})	$28,4 \pm 2,4$	$22,1 \pm 8,9$	$11,5 \pm 5,3$		
JG1738	$\Delta\lambda$ <i>bpfG</i> (C116S)	$23,8 \pm 7,9$	$29,5 \pm 12,8$	$16,1 \pm 5,2$	$18,9^* \pm 4,4$	
JG1475	$\Delta\lambda$ pBAD_leer	$21,2 \pm 4,2$	$20,6 \pm 5,6$	$15,9 \pm 4,4$	$7,6^{**}$	$3,7^{**}$
JG1758	$\Delta\lambda$ pBAD_aggA	$12,0 \pm 2,0$	$9,2 \pm 1,4$	$12,0 \pm 0,6$	$5,8 \pm 0,1$	$4,4 \pm 0,7$

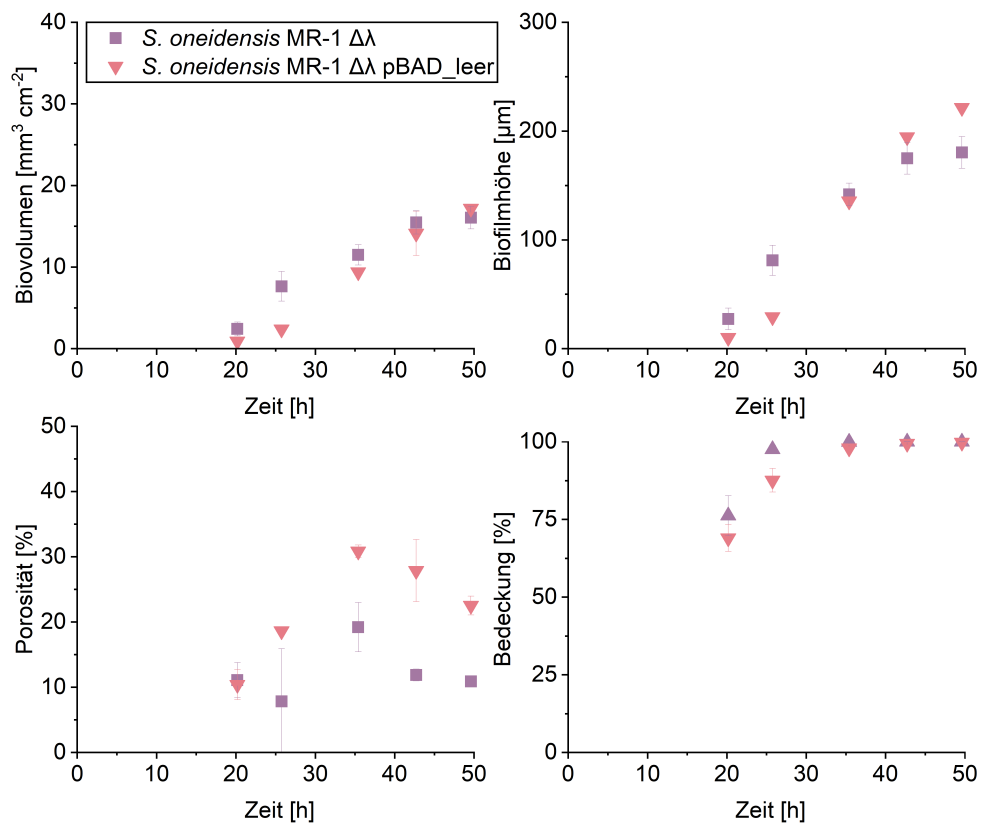


Abb. A9: Einfluss eines leeren Plasmids auf die Biofilmbildung von *S. oneidensis* unter anoxischen Bedingungen. Die Biofilme wurden mit Laktat als Elektronendonator und Fumarat als Elektronenakzeptor in mikrofluidischen Fließzellen kultiviert. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von unabhängigen Replikaten dar ($n = 3$). *S. oneidensis* MR-1 $\Delta\lambda$ = JG918 und *S. oneidensis* MR-1 $\Delta\lambda$ pBAD_leer = JG1475.

Tab. A7: **Einfluss von *bpfG* (C116S) sowie der Überexpression von *bpfA* und *aggA* auf die Biofilmhöhe unter anoxischen Bedingungen.** Die Kultivierung erfolgte mit Laktat als Elektronendonator und Fumarat als Elektronenakzeptor. Die Biofilmhöhe in μm ist über die Zeit für fünf verschiedene Stämme angegeben. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen aus unabhängigen Versuchen ($n = 3$). Eingefärbte Zellen zeigen signifikante Unterschiede zum Kontrollstamm mit dem leeren Plasmid an (ungepaarter t-Test: grün = $p < 0,01$; rot = $p < 0,05$). Die graphische Darstellung dieser Zahlen ist in Abb. 25 und 26 zu finden.

		20 h	26 h	35 h	43 h	50 h
JG918	$\Delta\lambda$	27,3 \pm 9,9	81,1 \pm 13,9	141,7 \pm 10,4	175,0 \pm 14,5	180,3 \pm 14,6
JG1739	$\Delta\lambda$ <i>bpfA</i> (P_{cymA})	10,2 \pm 2,7	18,8 \pm 4,5	114,3 \pm 24,3	161,4 \pm 19,3	185,6 \pm 27,1
JG1738	$\Delta\lambda$ <i>bpfG</i> (C116S)	17,6 \pm 8,6	31,4 \pm 10,7	199,4 \pm 16,0	236,9 \pm 43,6	314,9 \pm 78,6
JG1475	$\Delta\lambda$ pBAD_leer	10,1 \pm 0,5	29,1 \pm 3,1	135,6 \pm 3,7	194,5 \pm 23,6	221,5 \pm 3,2
JG1758	$\Delta\lambda$ pBAD_ <i>aggA</i>	37,4 \pm 9,7	54,0 \pm 8,0	150,3 \pm 10,7	210,0 \pm 6,7	227,4 \pm 9,4

Tab. A8: **Einfluss von *bpfG* (C116S) sowie der Überexpression von *bpfA* und *aggA* auf das Biovolumen unter anoxischen Bedingungen.** Die Kultivierung erfolgte mit Laktat als Elektronendonator und Fumarat als Elektronenakzeptor. Das Biovolumen in $\text{mm}^3 \text{cm}^{-2}$ ist über die Zeit für fünf verschiedene Stämme angegeben. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen aus unabhängigen Versuchen ($n = 3$). Eingefärbte Zellen zeigen signifikante Unterschiede zum Kontrollstamm mit dem leeren Plasmid an (ungepaarter t-Test: grün = $p < 0,01$; rot = $p < 0,05$). Die graphische Darstellung dieser Zahlen ist in Abb. 25 und 26 zu finden.

		20 h	26 h	35 h	43 h	50 h
JG918	$\Delta\lambda$	12,4 \pm 0,9	7,6 \pm 1,8	11,5 \pm 1,2	15,5 \pm 1,4	16,1 \pm 1,4
JG1739	$\Delta\lambda$ <i>bpfA</i> (P_{cymA})	1,0 \pm 0,2	1,7 \pm 0,4	7,2 \pm 1,2	9,5 \pm 0,9	11,8 \pm 1,3
JG1738	$\Delta\lambda$ <i>bpfG</i> (C116S)	1,8 \pm 0,6	3,4 \pm 0,4	21,1 \pm 12,0	22,2 \pm 4,3	22,6 \pm 4,7
JG1475	$\Delta\lambda$ pBAD_leer	0,9 \pm 0,0	2,4 \pm 0,3	9,4 \pm 0,1	14,1 \pm 2,7	17,2 \pm 0,4
JG1758	$\Delta\lambda$ pBAD_ <i>aggA</i>	3,5 \pm 1,0	5,3 \pm 0,9	14,5 \pm 1,2	19,8 \pm 0,7	20,8 \pm 0,9

Tab. A9: **Einfluss von *bpfG* (C116S) sowie der Überexpression von *bpfA* und *aggA* auf die Biofilmporosität unter anoxischen Bedingungen.** Die Kultivierung erfolgte mit Laktat als Elektronendonator und Fumarat als Elektronenakzeptor. Die Biofilmporosität in % ist über die Zeit für fünf verschiedene Stämme angegeben. Mittelwerte und Standardabweichungen stammen aus unabhängigen Versuchen ($n = 3$). Eingefärbte Zellen zeigen signifikante Unterschiede zum Kontrollstamm mit dem leeren Plasmid an (ungepaarter t-Test: grün = $p < 0,01$; rot = $p < 0,05$). Die graphische Darstellung dieser Zahlen ist in Abb. 25 und 26 zu finden.

		20 h	26 h	35 h	43 h	50 h
JG918	$\Delta\lambda$	11,1 \pm 2,7	7,8 \pm 8,1	19,2 \pm 3,8	11,9 \pm 0,9	10,9 \pm 0,4
JG1739	$\Delta\lambda$ <i>bpfA</i> (P_{cymA})	8,6 \pm 0,4	6,9 \pm 3,1	35,3 \pm 6,2	41,0 \pm 2,7	24,3 \pm 17,3
JG1738	$\Delta\lambda$ <i>bpfG</i> (C116S)	6,6 \pm 0,1	7,7 \pm 2,0	41,0 \pm 0,0	27,5 \pm 3,0	26,4 \pm 1,1
JG1475	$\Delta\lambda$ pBAD_leer	10,4 \pm 2,3	18,6 \pm 0,3	30,8 \pm 1,0	27,9 \pm 4,8	22,5 \pm 1,4
JG1758	$\Delta\lambda$ pBAD_ <i>aggA</i>	5,9 \pm 2,7	2,5 \pm 1,6	3,7 \pm 0,9	5,8 \pm 0,6	8,6 \pm 1,0