

**Untersuchung der Elektromethanogenese als eine mögliche Speichertechnologie für
erneuerbare Energien**

Vom Promotionsausschuss der
Technischen Universität Hamburg
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation
(Monografie)

von

Benjamin Rößler

aus

Karl-Marx-Stadt (jetzt Chemnitz)

2025

Betreuer: Prof. Dr. Johannes Gescher
Prof. Dr.-Ing. Kerstin Kuchta

Tag der mündlichen Prüfung: 13.10.2025

ORCID: 0000-0002-9504-6233

DOI: <https://doi.org/10.15480/882.16062>

Creative Commons Lizenzvertrag

Der 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.

Inhaltsverzeichnis

I	Abbildungsverzeichnis	VII
II	Tabellenverzeichnis.....	IX
III	Abkürzungsverzeichnis.....	X
	Abstract	11
	Kurzzusammenfassung.....	12
1	Einleitende Worte.....	13
2	Einleitung	16
2.1	Methanogenese.....	16
2.1.1	Stoffwechselweg der hydrogenotrophen Methanogenese.....	16
2.1.2	Termination via Cytochrom	18
2.1.3	Termination ohne Cytochrom	18
2.1.4	Anwendung der Methanogenese	19
2.2	Elektrobiotechnologie	20
2.2.1	Elektromethanogenese	20
2.2.2	Typische methanogene Archaeen in der Elektromethanogenese.....	21
2.2.3	Elektronentransfer	23
2.2.4	Bioelektrochemische Systeme.....	23
2.2.5	Membranen.....	27
2.2.6	Versauerung und Alkalisierung der H-Zelle	27
2.3	Elektrochemie.....	29
2.3.1	Redoxreaktionen.....	29
2.3.2	Elektrochemische Arbeitsweisen	30
2.3.3	Faraday'sche und nicht Faraday'sche Prozesse	30
2.3.4	Chronoamperometrie.....	31
2.3.5	Bilanzierung von bioelektrochemischen Systemen.....	31

3	Zielsetzung der Doktorarbeit.....	33
4	Material und Methoden	36
4.1	Medien.....	36
4.1.1	Minimalmedien	36
4.1.2	Weitere Medien und Lösungen	41
4.1.3	Antibiotika.....	42
4.2	Kultivierung von Anaerobiern.....	42
4.3	Verwendete Methanogene Kulturen.....	43
4.4	Isolierungsmethoden	43
4.4.1	Dilution-to-Extinction	44
4.4.2	Isolation über die Elektromethanogenese.....	45
4.4.3	Entfernen von Fremdbakterien.....	46
4.5	Molekularbiologische Untersuchungen.....	46
4.6	Mikroskopische Untersuchung.....	49
4.7	Konstruktion der H-Zellen	49
4.7.1	Kleines Reaktorsystem.....	50
4.7.2	Großes Reaktorsystem.....	51
4.7.3	Anaerobisierung der Reaktoren.....	56
4.7.4	Protonierung der Membran	56
4.7.5	Herstellung einer Silber-Silberchlorid-Elektrode.....	57
4.8	Rasterelektronenmikroskopie.....	57
4.9	Elektrochemische Experimente.....	57
4.9.1	Chronoamperometrie.....	57
4.9.2	Bilanzierung der elektrochemischen Experimente/Coulombsche Effizienz	58
4.9.3	Ablauf der bioelektrochemischen Versuche in der kleinen H-Zelle	59
4.9.4	Ablauf der bioelektrochemischen Versuche in der großen H-Zelle.....	59

5	Ergebnisse und Diskussion.....	60
5.1	Isolation von Methanogenen aus Biogasgärschlämmen	60
5.1.1	Dilution-to-Extinction	60
5.1.2	Isolierung von Methanogenen durch das Anlegen einer Spannung.....	61
5.1.3	Molekularbiologische Charakterisierung	61
5.1.4	Biochemische Charakterisierung.....	62
5.1.5	Fazit der Isolierung.....	62
5.2	Elektrochemische Versuche in den kleinen H-Zellen	64
5.2.1	Physikochemische Daten.....	64
5.2.2	Chronoamperometrische Messungen	66
5.2.3	Methan- und Wasserstoffkonzentrationen.....	69
5.2.4	Zellzahlen	73
5.2.5	Direkte vs. indirekte Elektromethanogenese.....	74
5.2.6	Bilanzierung der chronoamperometrische Messungen	75
5.2.7	Rasterelektronenmikroskopie der Kathoden	76
5.2.8	Fazit der Experimente in den kleinen H-Zellen	77
5.3	Elektrochemische Versuche in der großen H-Zelle	80
5.3.1	Physikochemische Daten.....	80
5.3.2	Chronoamperometrische Messungen	83
5.3.3	Methan- und Wasserstoffkonzentrationen.....	85
5.3.4	Zellzahlen	88
5.3.5	Bilanzierung der chronoamperometrischen Messungen	90
5.3.6	Rasterelektronenmikroskopie der Kathoden	92
5.3.7	Fazit für Experimente in der großen H-Zelle	93
5.4	Lastenwechsel in großen H-Zelle.....	95
5.4.1	Chronoamperometrische Messungen	97
5.4.2	Methan- und Wasserstoffkonzentrationen und Zellzahlen.....	98
5.4.3	Bilanzierung der chronoamperometrischen Messungen	102

5.4.4	Rasterelektronenmikroskopie der Kathoden	104
5.4.5	Fazit über den Lastenwechsel in der großen H-Zelle.....	105
5.5	Untersuchung der Stabilität des Prozesses bei Medienwechsel	107
5.5.1	Physikochemische Daten.....	107
5.5.2	Coulombsche Effizienz und Methanproduktion.....	109
5.5.3	Chronoamperometrischen Messungen	110
5.5.4	Veränderungen der planktonischen Zellzahl durch den Medienwechsel.....	112
5.5.5	Untersuchung des gealterten Mediums auf das Wachstum von <i>Mc. maripaludis</i> ...	112
5.5.6	Rasterelektronenmikroskopie der Kathoden	114
5.5.7	Fazit für Experimente im großen Reaktor.....	116
6	Zusammenfassung	118
7	Schlussfolgerung	121
8	Ausblick	124
IV	Literaturverzeichnis	126
V	Anhang	XI

I Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Zusammenstellung der Stromerzeugung in Deutschland im Jahr 2020.....	13
Abbildung 2 Stoffwechsel der hydrogenotrophen Methanogenese	17
Abbildung 3 Untergliederung der Elektrobiotechnologie.....	24
Abbildung 4 Schematischer Aufbau eines Two-Chamber Reaktors.....	25
Abbildung 5 Grundaufbau einer galvanischen und elektrolytischen Zelle	27
Abbildung 6 Prinzipieller Ablauf der Versauerung und Alkalisierung der H-Zelle	28
Abbildung 7 Isolierungsstrategien	45
Abbildung 8 Aufbau der kleinen H-Zelle.....	50
Abbildung 9 Aufbau der großen H-Zelle	52
Abbildung 10 Rohrleitungs- und Instrumentenfließschema der großen H-Zelle.....	54
Abbildung 11 Zustände in der großen H-Zelle	55
Abbildung 12 Ausschnitt des Elektropherogramms der <i>mcrA</i> -Gene der Kultur 11	62
Abbildung 13 Chronoamperometrische Messungen der Elektrofermentationen bei -300 mV.....	67
Abbildung 14 Chronoamperometrische Messungen der Elektrofermentationen bei -700 mV.....	68
Abbildung 15 Methan- und Wasserstoffkonzentrationen unter zwei verschiedenen Potentialen.....	72
Abbildung 16 Vergleich der nachweisbaren Wasserstoffkonzentration in den Referenzzellen	73
Abbildung 17 Coulombsche Effizienz von Methan gegen die Methanproduktion.....	76
Abbildung 18 REM-Aufnahmen der Elektrodenoberflächen	77
Abbildung 19 pH-Wert Messungen innerhalb der großen H-Zelle.....	82
Abbildung 20 Druckverlauf innerhalb des Experiments in der großen H-Zelle	83
Abbildung 21 Chronoamperometrische Messungen in großen H-Zelle	85
Abbildung 22 Methan- und Wasserstoffgehalte in der großen H-Zelle.....	88
Abbildung 23 Coulombsche Effizienzen unter Verwendung des Methanogens <i>Mc. maripaludis</i>	91
Abbildung 24 REM-Aufnahmen der Kathodenoberflächen nach der Elektrofermentation.....	93
Abbildung 25 Gesamter pH-Verlauf bei der Untersuchung des Lastenwechsels	96
Abbildung 26 Druckkurve bei der Untersuchung des Lastenwechsels.....	97
Abbildung 27 Chronoamperometrische Messung beim Lastenwechsel	98
Abbildung 28 Darstellung der Δ Konzentrationen (t_0-t_1) von Methan und Wasserstoff.....	100
Abbildung 29 Darstellung der kumulierten Methan- und Wasserstoffkonzentrationen	101
Abbildung 30 Coulombsche Effizienzen Anwachsphase und Tag-Nach-Rhythmus.....	103
Abbildung 31 REM-Aufnahmen der Kathodenoberflächen nach dem Tag-Nacht-Rhythmus	105
Abbildung 32 pH-Verlauf der Kathoden- und Anodenseite zu der Untersuchung der Stabilität.....	108

Abbildung 33 Druckverlauf zu der Untersuchung der Stabilität der Elektromethanogenese	108
Abbildung 34 Bilanzierung zu der Untersuchung der Stabilität der Elektromethanogenese.....	110
Abbildung 35 Chronoamperometrische Messung zu der Untersuchung der Stabilität.....	111
Abbildung 36 Zellzahlen nach der Inkubation und nach den Medienwechseln	113
Abbildung 37 Eigenfärbung des Mediums im großem Reaktor	114
Abbildung 38 REM-Aufnahmen der Kathodenoberflächen nach dem Medienwechsel.....	116
Abbildung 39 Technische Zeichnung für den Deckel des kleinen Reaktors	XI
Abbildung 40 Technische Zeichnung für den Deckel der großen H-Zelle	XII
Abbildung 41 Grafische Oberfläche für die Anaerobisierung der großen H-Zelle.....	XIII
Abbildung 42 Grafische Oberfläche für das Spülen mit CO ₂	XIII
Abbildung 43 Grafische Oberfläche für gezielte Ansteuerung der einzelnen Ventile.....	XIV
Abbildung 44 Grafische Oberfläche für die Kontrolle der einzelne Parameter	XIV
Abbildung 45 Grafische Oberfläche für eine separate Messung der Gaszusammensetzung	XV
Abbildung 46 Ablauf für die Herstellung einer Ag/AgCl Elektrode	XVI
Abbildung 47 Übersicht der einzelnen Abschnitte für die Isolierung der Kultur 11	XVII
Abbildung 48 Temperaturkurve Kultur K11	XVIII
Abbildung 49 pH-Kurve Kultur K11	XVIII
Abbildung 50 Einzelnen Abschnitte für die Isolierung via Anlegen einer Spannung	XIX
Abbildung 51 Temperaturkurve Kultur EE.....	XX
Abbildung 52 pH-Kurve Kultur EE	XX
Abbildung 53 Physikochemische Daten von <i>Methanobacterium congolense</i> Anode	XXII
Abbildung 54 Physikochemische Daten von <i>Methanobacterium congolense</i> Kathode	XXII
Abbildung 55 Physikochemische Daten von <i>Methanococcus maripaludis</i> Anode	XXIII
Abbildung 56 Physikochemische Daten von <i>Methanococcus maripaludis</i> Kathode	XXIII
Abbildung 57 Physikochemische Daten von <i>Methanosarcina barkeri</i> Anode.....	XXIV
Abbildung 58 Physikochemische Daten von <i>Methanosarcina barkeri</i> Kathode.....	XXIV
Abbildung 59 Physikochemische Daten von <i>Methanobacterium formicicum</i> Anode	XXV
Abbildung 60 Physikochemische Daten von <i>Methanobacterium formicicum</i> Kathode	XXV
Abbildung 61 Physikochemische Daten von K11 Anode.....	XXVI
Abbildung 62 Physikochemische Daten von K11 Kathode	XXVI
Abbildung 63 Physikochemische Daten von EE Anode.....	XXVII
Abbildung 64 Physikochemische Daten von EE Kathode	XXVII

II Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Wachstums-Charakteristika für ausgewählte Methanogene	22
Tabelle 2 Redoxpotentiale von verschiedenen Reaktionen bei pH 7.....	29
Tabelle 3 Literaturübersicht über die erfolgten Forschungsergebnisse.....	33
Tabelle 4 Marcoelementlösung des HAW-Minimalmediums auf 1 L, pH 7,6	37
Tabelle 5 Spurenelementlösung des HAW-Minimalmediums auf 1 L, pH 7,6	37
Tabelle 6 Makroelementlösung des 141 Mediums ad 1L auf pH 7,2 einstellen	38
Tabelle 7 Spurenelementlösung des 141 Mediums ad 1 L, pH 7,6.....	38
Tabelle 8 Vitaminlösung der Minimalmedien ad 0,5 L	39
Tabelle 9 Resazurinlösung ad 0,1 L	39
Tabelle 10 Imidazolösung ad 0,1 L, pH 7,6.....	39
Tabelle 11 Eisen-Cysteinlösung ad 0,05L.....	39
Tabelle 12 Natriumsulfitlösung ad 0,01 L.....	39
Tabelle 13 Titancitratlösung ad 0,05 L	40
Tabelle 14 Pipettierschema für die Herstellung des HAW-Minimalmediums.....	40
Tabelle 15 Pipettierschema für die Herstellung des 141 Minimalmediums	40
Tabelle 16 Synthetisches Harnstoffmediu ad 1 L; pH 7,6	41
Tabelle 17 Überarbeitetes Medium 120c von der DSMZ ad 1,0 L.....	41
Tabelle 18 PBS Lösung ad 1,0 L.....	42
Tabelle 19 Verwendete Antibiotika	42
Tabelle 20 Auflistung der verwendeten Primer für die molekularbiologischen Untersuchungen	47
Tabelle 21 Pipettierschema für einen PCR-Ansatz	48
Tabelle 22 Schritte der PCR für die 16S rRNA-Gen-Analyse.....	48
Tabelle 23 Schritte der PCR für die mcrA-Gen-Analyse.....	48
Tabelle 24 Zellzahl der einzelnen Kulturen bei verschiedenen Potentialen	74
Tabelle 25 Zusammenfassung der Coulombschen Effizienzen	76
Tabelle 26 Zellzahl pro mL in der großen H-Zelle bei verschiedenen Potentialent.	89
Tabelle 27 Zellzahl pro mL während der Untersuchung des Tag-Nacht-Rhythmus.	102
Tabelle 28 Zellzahl pro mL der Untersuchung der Stabilität der Elektromethanogenese	112

III Abkürzungsverzeichnis

AC	Alternating current - Wechselstrom
AE	Arbeitselektrode
BES	Bioelektrochemische Systeme
CE	Coulombsche Effizienz
DC	Direct current - Gleichstrom
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E^0	Standardelektrodenpotential
EET	Extrazellulärer Elektronentransfer
EM	Elektromethanogenese
GE	Gegenelektrode
Mb	<i>Methanobacterium</i>
Mc	<i>Methanococcus</i>
MEC	Microbial electrolysis cell
MES	Microbial electrosynthesis
MFC	Microbial fuel cell
Ms	<i>Methanosarcina</i>
RE	Referenzelektrode
REM	Rasterelektronenmikroskopie
SHE	Standardwasserstoffelektrode

Abstract

Efficient storage technologies are essential for the global energy transition. These technologies help to stabilise the grids and ensure security of supply. One starting point is the storage of renewable energies in methane. Methane can be produced microbially using carbon dioxide (CO₂). Electromethanogenesis (EM) is an innovative way of storing renewable energy in the form of methane. In EM, CO₂ is utilised together with electricity in the form of an applied voltage and converted into methane by special microorganisms. This study contributes to the further understanding of EM and its suitability for a future storage technology. The focus was divided into three research questions: 1) more powerful methane producers through special isolation methods, 2) the need for hydrogen and 3) the flexibility of EM.

In this work, two strains of the species *Methanobacterium formicicum* were isolated: K11 and EE. Both strains showed a 50 % better methane formation rate compared to the reference strain. However, the type of isolation, with or without applied voltage, had no influence on the suitability for EM. The necessity of hydrogen for EM was analysed using two different potentials: -300 mV and -700 mV vs. standard hydrogen electrode (SHE). The potential of -300 mV was used to investigate direct EM without abiotically formed hydrogen. For indirect EM with hydrogen as an intermediate, a potential of -700 mV was applied. The results of this study show that no significant methane production occurred in all six methanogenic pure cultures tested in direct EM. In contrast, indirect EM achieved significant methane production. The best results were achieved by the pure culture of *Methanococcus maripaludis* with a daily methane production rate of 61 mmol/(m² d) and a coulombic efficiency of 73 %.

The results show that abiotically produced hydrogen is crucial for methane production and that a dense, intact biofilm at the cathode correlates with high efficiency. Further investigations into EM were carried out in a specially designed, semi-automated system with *Mc. maripaludis*. Short-term methane production rates of 940 mmol/(m² d) with an efficiency of over 90 % at a potential of -800 mV vs. SHE was achieved. However, stable methane production was only achieved at -700 mV vs. SHE. A simulation of a highly simplified photovoltaic system was used to investigate the flexibility of the EM. It was found that such flexible process control is possible, and that EM is therefore suitable for system-beneficial energy storage.

Kurzzusammenfassung

Für die globale Energiewende sind effiziente Speichertechnologien unerlässlich. Sie tragen zur Stabilisierung der Netze und zur Versorgungssicherheit bei. Ein Ansatzpunkt ist die Speicherung von erneuerbaren Energien in Methan. Unter der Nutzung von Kohlenstoffdioxid (CO₂) lässt sich Methan mikrobiell erzeugen. Eine innovative Speicherung von erneuerbaren Energien in Form von Methan stellt die Elektromethanogenese (EM) dar. Bei der EM wird CO₂ zusammen mit Strom in Form einer angelegten Spannung genutzt und von speziellen Mikroorganismen zu Methan umgesetzt. Diese Studie trägt zum weiteren Verständnis der EM und zur Eignung dieser für eine künftige Speichertechnologie bei. Im Fokus standen drei Forschungsfragen: 1) leistungsstärkere Methanbildner durch spezielle Isoliermethoden, 2) Notwendigkeit von Wasserstoff und 3) Flexibilität der EM.

In dieser Arbeit wurden zwei Stämme der Spezies *Methanobacterium formicicum* isoliert: K11 und EE. Beide Stämme zeigten im Vergleich zum Referenzstamm eine um 50 % bessere Methanbildungsrate. Die Art der Isolierung, mit oder ohne angelegter Spannung, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Eignung für die EM. Die Notwendigkeit von Wasserstoff für die EM wurde anhand zwei verschiedener Potentiale untersucht: -300 mV und -700 mV vs. Standardwasserstoffelektrode (SHE). Das Potential von -300 mV wurde zur Untersuchung der direkten EM ohne abiotisch gebildeten Wasserstoff genutzt. Für die indirekte EM mit Wasserstoff als Intermediat wurde ein Potential von -700 mV angelegt. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass bei der direkten EM bei allen sechs getesteten methanogenen Reinkulturen, keine signifikante Methanproduktion stattfand. Bei der indirekten EM wurde dagegen eine deutliche Methanproduktion erreicht. Die besten Ergebnisse erzielte die Reinkultur von *Methanococcus maripaludis* mit einer täglichen Methanbildungsrate von 61 mmol/(m² d) mit einer coulombschen Effizienz von 73 %. Die Ergebnisse zeigen, dass abiotisch produzierter Wasserstoff entscheidend für die Methanproduktion ist und dass ein dichter, intakter Biofilm an der Kathode mit hoher Effizienz korreliert. Für weitere Untersuchungen zur EM wurden in einem eigens designten, halbautomatisierten System mit *Mc. maripaludis* durchgeführt. Es konnten kurzzeitig Methanproduktionsraten von 940 mmol/(m² d) mit einer Effizienz von über 90 % bei einem Potential von -800 mV vs. SHE erreicht werden. Eine stabile Methanproduktion gelang jedoch nur bei -700 mV vs. SHE. Zur Untersuchung der Flexibilität der EM wurde eine Simulation einer stark vereinfachten Photovoltaikanlage verwendet. Es stellte sich heraus, dass eine solche flexible Prozessführung möglich ist und die EM sich daher zur systemdienlichen Energiespeicherung eignet.

1 Einleitende Worte

Neben dem Ausbau von erneuerbaren Energien ist die Vermeidung von Emissionen an Kohlenstoffdioxid (CO₂) der wichtigste Punkt zur Minderung des Klimawandels. CO₂-Emissionen entstehen größtenteils durch die Verbrennung von organischen Materialien. Durch die industrielle Revolution und den hohen Bedürfnissen an Energie, werden exzessiv fossile Rohstoffe genutzt, um diesen „Energiehunger“ zu stillen. Dieser Energiebedarf muss künftig durch erneuerbare Energien gedeckt werden. Dieses kann zum Teil durch die Nutzung von Biomasse geschehen [1]. Im Jahr 2020 wurden 65,5 % der erzeugten Energie aus der Verbrennung von fossilen Rohstoffen erzeugt und nur 1,9 % durch die Nutzung von Biomasse, siehe Abbildung 1 [2–4].

Neben der Reduktion von CO₂-Emissionen sollte ebenfalls auf das „Abfangen“ von unumgänglichen CO₂-Abgasen sowie die zusätzliche Reduktion von vorhandenem CO₂ in der Atmosphäre in Betracht gezogen werden. Für die Herstellung von Methan, Methanol oder anderen Grundchemikalien kann perspektivisch das abgetrennte CO₂ aus Abgasen oder atmosphärisches CO₂ genutzt werden, welches über Carbon Capture Methoden fixiert wurde.

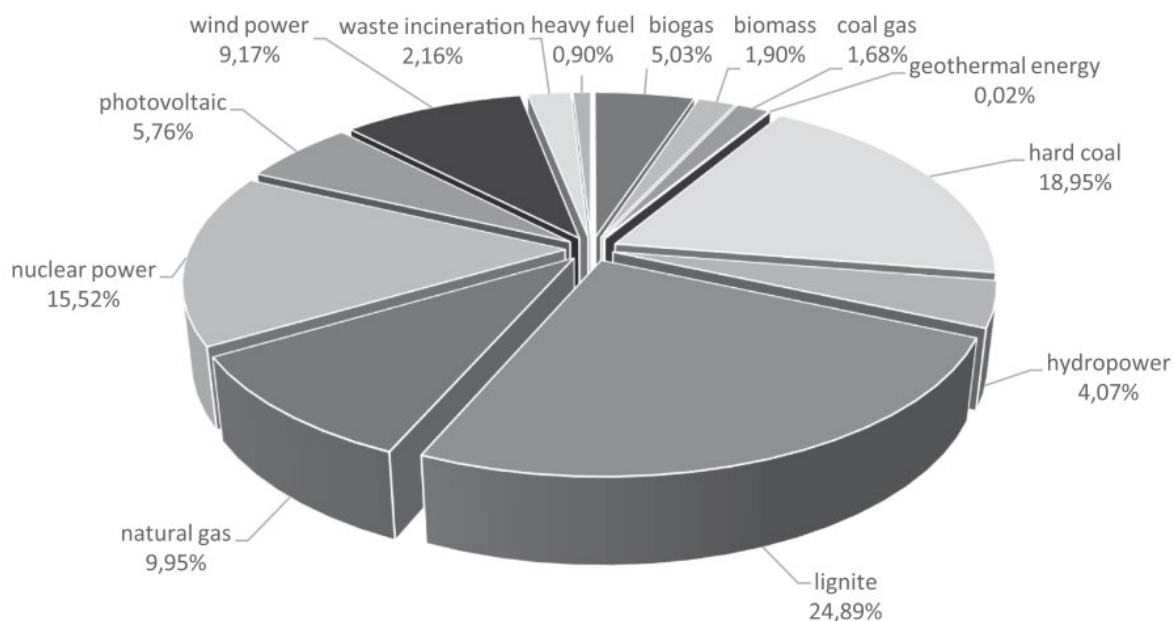
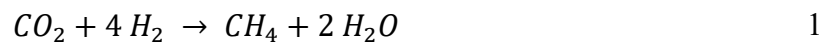


Abbildung 1 Zusammenstellung der Stromerzeugung in Deutschland im Jahr 2020, unverändert entnommen von [2]

Neben der Verbrennung von fossilen Rohstoffen für die Energiegewinnung wird CO₂ in großen Mengen zusätzlich in der Industrie freigesetzt, z. B. als Nebenprodukt in der Ammoniak- und Zementproduktion [4–6].

Das CO₂ aus den zuletzt genannten Emissionsquellen kann jedoch nicht komplett vermieden werden, da das CO₂ ein Reaktionsprodukt des jeweiligen chemischen Prozesses darstellt. Die Anwendung von Prozessen mit Carbon Dioxid Removal, wie die Plasmalyse, kann Kohlenstoff dauerhaft in Form von festem Kohlenstoff aus der Atmosphäre entfernen. Bei Prozessen von Carbon Dioxide Utilization wird CO₂ als Ausgangsstoff für Umwandlungsprozesse bzw. als Grundchemikalie genutzt. Eine Methode zur Umwandlung von CO₂ in eine für den Menschen nutzbare Form ist die Methanisierung, in der CO₂ zu Methan (CH₄) umgesetzt wird.



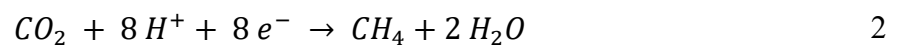
Dieser spezielle Prozess wird vielfältig genutzt, unter anderem in Biogasanlagen, um CH₄ zu erzeugen. Das aufwendig gereinigte Biomethan besitzt die gleiche Reinheit wie Erdgas und kann somit in das bestehende Erdgasnetz eingespeist werden. Das erzeugte Biomethan kann bilanziell CO₂-neutral sein, wenn der Kohlenstoff des natürlichen CO₂-Kreislaufs, insbesondere aus Reststoffen der Landwirtschaft, umgesetzt wurde [2,5,7–10].

Neben der chemisch-physikalischen Reinigung des Biogases zu Biomethan, kann das Biogas ebenfalls über die Methanisierung zu reinen Biomethan aufgewertet werden. Die konventionelle, chemische Methanproduktion, die chemische Methanisierung, erfolgt über die Reduktion von CO₂ mit Wasserstoff (H₂) zu CH₄ über den Sabatier-Prozess. Dieser Prozess nutzt Temperaturen zwischen 250 – 600 °C und Metallkatalysatoren, zumeist mit Nickel als Hauptbestandteil, mit einer Effizienz zwischen 67 – 82 % [7,11–13]. Bei dem biologischen Prozess der Methanisierung, der *in-situ* bzw. der *ex-situ* biologischen Methanisierung, werden zwei Prozesse miteinander gekoppelt. Zunächst wird Wasserstoff über eine Elektrolyse hergestellt und anschließend direkt in eine Biogasanlage (*in-situ*) eingeleitet oder das Biogas einer Biogasanlage oder anderes CO₂-haltiges Gas mit dem Wasserstoff in einem separaten Reaktor (*ex-situ*) umgesetzt. Da bei beiden Arten der biologischen Methanisierung Mikroorganismen als Katalysatoren fungieren, finden diese Prozesse bei moderaten Temperaturen (37-70 °C) und geringen Drücken von 1-16 bar statt [7,11,12].

Carbon Capture Methoden, wie z. B. Direct Air Carbon Capture für die Gewinnung von CO₂ aus der Atmosphäre und die Methanisierung können in Kombination genutzt werden, um elektrische Energie in chemische Energie umzuwandeln. Diese Energieträger, wie z. B. Methan, können langfristig gespeichert werden und verlieren keine Energie, anders als Batterien. Das erwähnte Prinzip der Nutzung und Umwandlung von Strom in eine andere, speicherbare Energie wird als Power-to-X bezeichnet. Power-to-Gas beschreibt dabei die

Umwandlung von Strom in Gas [14]. Eine mögliche Power-to-Gas Technologie für die künftige Energiespeicherung könnte die Elektromethanogenese sein.

Die Elektromethanogenese ist eine vielversprechende Methode für die mikrobielle Umwandlung von Strom in Methan. Bei dieser Technologie wird Wasserstoff nicht separat in einem Elektrolyseur hergestellt und in den Prozess geleitet, sondern entsteht direkt an der Elektrode. Dieser Wasserstoff wird von den verwendeten Mikroorganismen unmittelbar aufgenommen und in Methan umgewandelt. Dabei ist nicht vollständig geklärt, ob die Mikroorganismen den entstehenden Wasserstoff aufnehmen (Gleichung 1) oder direkt Elektronen und Protonen (Gleichung 2) nutzen können.



In dieser Dissertation soll die Elektromethanogenese als eine mögliche künftige Speichertechnologie eingehend untersucht werden. Dabei werden mehrere Aspekte der Elektromethanogenese betrachtet. Es werden unter anderem geeignete Mikroorganismen untersucht, chemische und physikalische Parameter optimiert, Effizienzen ermittelt, die Stabilität des Prozesses überprüft und die Verwendung der Elektromethanogenese unter intermittierenden Spannungen genauer beschreiben.

2 Einleitung

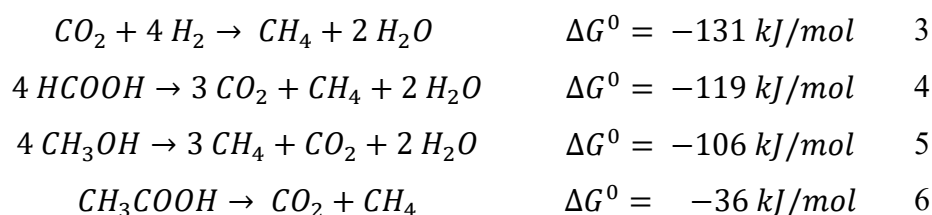
2.1 Methanogenese

Die Methanogenese beschreibt die biologische Gewinnung von Methan durch die Reduktion von Kohlenstoffdioxid. Dieser mikrobielle Stoffwechselweg wird von methanogenen Archaeen durchgeführt. Archaeen zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, in extremen Umweltbedingungen überleben zu können. Neben den Bakterien und Eukaryoten bilden die Archaeen die dritte Domäne des Lebens [15,16].

In das diverse Phylum der *Euryarchaeota*, werden die methanbildenden Archaeen, die Methanogenen, eingeordnet. Dabei zeichnen sich die Ordnungen der *Methanobacteriales* und *Methanomicrobiales* durch deren zumeist wasserstoffverwertenden, den hydrogenotrophen, Stoffwechsel aus [17].

2.1.1 Stoffwechselweg der hydrogenotrophen Methanogenese

Die Methanogenese beschreibt die vollständige Reduktion von CO_2 zu CH_4 unter Einbezug von Wasserstoff. Innerhalb des natürlichen CO_2 -Kreislaufs entsteht jährlich ca. 1 Gt an CH_4 , davon werden etwa 70 % durch die Methanogenese erzeugt [18,19]. Die Methanogenen leben vielfach autotroph von Kohlenstoffdioxid und besitzen eine hohe phylogenetische Diversität [18,20]. Ein großer Teil der Methanogene lebt hydrogenotrophe mit H_2 als Hauptenergiequelle (Gleichung 3). Des Weiteren können manche Methanogene einfache C-Verbindungen als Energiequelle nutzen, z. B. Formiat, Methanol und Essigsäure (Gleichungen 3 – 6).



Basierend auf den Edukten wird die Methanogenese in die hydrogenotrophe, acetoklastische und die methylotrophe Methanogenese unterteilt. Bei der hydrogenotrophen Methanogenese wird als direkter Elektronendonator Wasserstoff oder Formiat (Gleichung 3) genutzt. In der acetoklastischen Methanogenese (Gleichung 6, z. B. *Methanosarcina barkeri*) werden die Elektronen über einen Membrankomplex via Cytochrome transportiert [21,22]. In der methylotrophen Methanogenese (Gleichung 6, z. B. *Methanosarcina mazei*) wird ein Substrat,

z. B. Methanol, nicht über mehrere Schritte reduziert, sondern direkt an das Stoffwechselintermediat Coenzym M gebunden. Dabei entstehen CO_2 und CH_4 [18].

Der Stoffwechselweg der hydrogenotrophen Methanogenese wurde schon vielfältig beschrieben und ist in der Abbildung 2 grafisch dargestellt [21,23–29]. Diese Art des Stoffwechsels besitzen die meisten hydrogenotrophen, methanogenen Archaeen [19].

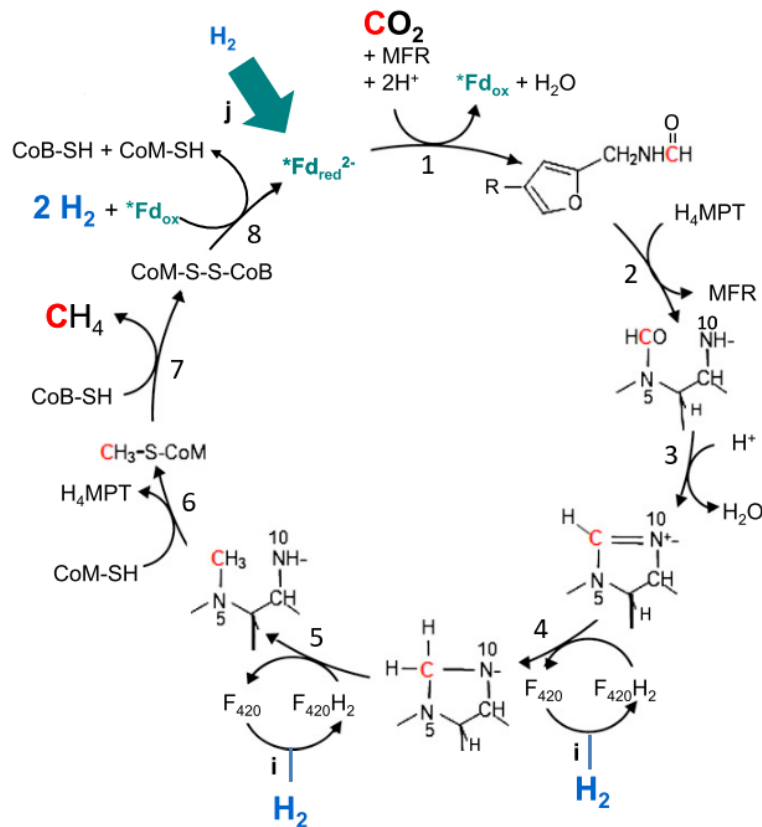


Abbildung 2 Stoffwechsel der hydrogenotrophen Methanogenese, modifiziert nach [23]

Der Stoffwechselweg der Methanogenese beginnt mit der Fixierung von Kohlenstoffdioxid an Methanofuran (MFR) (Reaktion 1, Abbildung 2). Bei dieser Reaktion wird Ferredoxin unter der Entstehung von N-Formylmethanofuran (CHO-MFR) oxidiert. In der Folgereaktion wird MFR durch Tetrahydromethanopterin (H_4MPT) ersetzt (Reaktion 2). Es entsteht $\text{CHO-H}_4\text{MPT}$. Unter Einbezug von einem Proton wird die Aldehydgruppe von $\text{CHO-H}_4\text{MPT}$ zu $\text{CH-H}_4\text{MPT}$ reduziert (Reaktion 3). Anschließend wird die CH -Gruppe über die Oxidation von $\text{F}_{420}\text{H}_2 \rightarrow \text{F}_{420} + \text{H}_2$ zu $\text{CH}_3\text{-H}_4\text{MPT}$ reduziert (Reaktionen 4 und 5). Bei dieser Reaktion werden direkt die Elektronen des Wasserstoffes genutzt [30].

Anschließend erfolgt die Übertragung der Methylgruppe ($-\text{CH}_3$) auf das Coenzym M (CoM), dabei entsteht eine Disulfidbrücke zwischen CH_3 und CoM (Reaktion 6). Durch die Übertragung von CH_3 auf CoM wird H_4MPT freigesetzt (Reaktion 7). Anschließend wird das

CoM des CH₃-S-CoM-Komplexes an CoB gebunden (Reaktion 8). Diese Reaktion ist die einzige innerhalb der Methanogenese, welche irreversible ist und wird durch das Enzym MCR, Methyl-Coenzyme M Reduktase, katalysiert [31]. Hierdurch wird oxidiertes Ferredoxin reduziert, welches in der Reaktion 1 benötigt wird. Dabei wird eine Disulfidbrücke zwischen CoM und CoB gebildet, es entsteht CoM-S-S-CoB. Durch die Bindung von CoM an CoB wird Methan in die Umgebung abgegeben. Die Regeneration der Oxidations- und Reduktionspartner, sowie die Oxidation von CoM-S-S-CoB ist abhängig davon, ob die Methanogenese zytoplasmatisch oder membrangebunden abläuft [21].

2.1.2 Termination via Cytochrom

Der letzte Schritt der hydrogenotrophen Methanogenese von Methanogenen mit Cytochromen erfolgt membrangebunden vor allem bei *Methanosarcinales* (z.B. *Methanosarcina*, *Methanosaeta* und *Methanobolus*). Bei der Spaltung des Heterosulfids CoM-S-S-CoB werden Protonen an die Umgebung über den Transmembrankomplex VhoACG – HdrDE abgegeben. Dabei erfolgt eine Reduzierung von Ferredoxin über die energiekonservierte Hydrogenase EchA-F [9,21].

2.1.3 Termination ohne Cytochrom

Der letzte Schritt der hydrogenotrophen Methanogenese von Methanogenen ohne Cytochrom erfolgt durch einen energetisch gekoppelten cytoplasmatischen Enzymkomplex. Dieser Weg wird vor allem durch die Ordnung der *Methanobacteriales*, *Methanococcus*, *Methanomicrobiales* und *Methanopyrales* genutzt. Die Spaltung des CoM-S-S-CoB Komplexes erfolgt durch die Elektronenbifurkation. Dabei wird eine endergone Reaktion (nicht spontan) mit einer exergonischen Reaktion (spontan) gekoppelt. Diese reversible Reaktion geschieht unter einem minimalen Energieverlust bei einer maximalen Konservierung der Energie. Das bedeutet, eine exergone Reaktion wird genutzt, um eine endergone Reaktion auszuführen [32]. Dabei wird unter Einbindung von Wasserstoff und der Reduktion von Ferredoxin das Heterodisulfid CoM-S-S-CoB in die jeweiligen Cofaktoren gespalten und ATP generiert [7,9,12,19,21].

2.1.4 Anwendung der Methanogenese

Die mikrobielle Reduktion von Kohlenstoffdioxid zu Methan ist ein weitverbreiteter Stoffwechselweg, welcher für die regenerative Erzeugung von grünem Strom genutzt werden kann [33]. Für diesen Stoffwechselweg ist Wasserstoff ein essenzieller Elektronendonator, welcher insgesamt 4-mal in dem Kreislauf der Methanogenese benötigt wird, siehe Abbildung 2, Gleichung 4, 5 und 8.

Für eine optimale Ausbeute in der biologischen *in-situ* Methanisierung wird zusätzlich Wasserstoff hinzugefügt [34]. Die Erzeugung von Wasserstoff ist jedoch energie-intensiv und/oder wird durch die Dampfreformation bei der Erdölgewinnung erzeugt, welches zusätzlich die Umwelt belastet.

Die der Methanogenese verwandte Technologie der Elektromethanogenese soll den benötigten separaten Wasserstoff ersetzen, da die Elektronen über eine angelegte Spannung direkt von den Methanogenen aufgenommen werden könnten [35]. Dadurch muss kein externer Wasserstoff dem jeweiligen Reaktor hinzugefügt werden.

2.2 Elektrobiotechnologie

Die Elektrobiotechnologie beschreibt die stoffliche Umsetzung von organischen Verbindungen unter der Nutzung bzw. der Erzeugung von elektrischem Strom. Dabei werden unterschiedliche Gebiete der Biotechnologie neu betrachtet, z. B. die Abwasserbehandlung, die Methanisierung und die Katalyse von biochemischen Reaktionen [36,37].

Die erste Publikation im Bereich der Elektrobiotechnologie wurde mit *Saccharomyces cerevisiae* von Potter *et al.* 1910 durchgeführt [38]. Seitdem hat die Elektrobiotechnologie langsam an Bedeutung gewonnen und schon seit den 70iger Jahren wird intensiver in diesen Bereich geforscht [39].

2.2.1 Elektromethanogenese

Die Elektromethanogenese (EM) gehört zur Elektrobiotechnologie und ist eine spezielle Form der Methanogenese. Die Besonderheit an der EM ist, dass Elektronen und Protonen in einem Spannungsfeld die Methanogenese aufrecht erhalten können [40]. Der Begriff der Elektromethanogenese wurde durch Cheng *et al.* 2009 geprägt und kann als Startpunkt der Forschung der Elektromethanogenese gesehen werden [35,40].

Ragab *et al.* 2020 untersuchte den Einfluss des verwendeten Potentials (-1,0 V; -0,75 V für 45 min und -0,75 V für 90 min) auf das Transkriptom einer anaeroben Mischkultur, welche durch *Methanobacterium sp.* Stamm 34x dominiert wurde. Dabei lag der Fokus auf dem Coenzym F₄₂₀ und dem Coenzym M des Methan-Metabolismus. Dabei konnte festgestellt werden, dass die jeweiligen Potentiale keinen wesentlichen Einfluss auf die metabolische Aktivität von Coenzym F₄₂₀ und Coenzym M zeigten. In der Kohlenstofffixierung wurde die Acetyl-Coenzym A Synthetase jedoch beim Anlegen eines höheren Potentials höher exprimiert. Dieser Enzymkomplex wandelt Acetat in Acetyl-CoA über den reduktiven Acetyl-CoA-Stoffwechselweg um. Das Acetyl-CoA kann wiederum von der Ferredoxin Oxidoreduktase verwendet werden, um Pyruvat herzustellen, welches ebenfalls eine erhöhtes Expressionslevel zeigte. Diese Ergebnisse deuten an, dass durch das Anlegen eines Potentials eine höhere metabolische Aktivität vorliegen könnte [41,42].

Die Gruppe um Pelaz *et al.* 2022 untersuchte ebenfalls den Metabolismus der EM und zeigte, dass die EM ein zweistufiger Prozess sein kann. Dieser indirekte Prozess der EM besteht aus der abiotischen Wasserstoffproduktion (HER - Hydrogen Evolution Reaktion) und der Aufnahme des Wasserstoffes durch die hydrogenotrophen Methanogenen [3,4,43–48]. In dieser Arbeit wird dieser zweiteilige Prozess als indirekte EM bezeichnet.

2.2.2 Typische methanogene Archaeen in der Elektromethanogenese

Methanosarcina barkeri

Die Art *Methanosarcina barkeri* (*Ms. barkeri*) ist ein kokkenförmiger, Agglomerate bildender, methanogener Mikroorganismus. Archaeen dieser Gattung sind fähig die hydrogenotrophe, methylotrophe und acetoklastische Methanogenese durchzuführen und haben daher ein großes Spektrum an nutzbaren Substraten [49,50]. *Ms. barkeri* wächst in einen pH-Bereich von 5,5 – 7,5 mit einem Optimum von 7,0. Das nutzbare Temperaturspektrum erstreckt sich von 25 – 45 °C mit einem Optimum bei 37 °C [50,51]. *Ms. barkeri* kann minimale Methankonzentrationen unter elektroaktiven Bedingungen produzieren [52].

Methanobacterium congolense

Methanobacterium congolense (*Mb. congolense*) ist ein stäbchenförmiges, nicht bewegliches, mesophiles, Gram-positives, hydrogenotrophes, methanogenes Archaeon, welches erstmals 2001 aus einer Biogasanlage (Substrat: Maniokwurzeln) isoliert wurde. *Mb. congolense* wächst und produziert Methan, wenn Wasserstoff und CO₂ als Substrat vorliegen. Das Temperaturspektrum liegt zwischen 25 – 50 °C, mit einem optimalen Bereich zwischen 37 – 42 °C. Des Weiteren kann *Mb. congolense* in einem sehr weiten pH-Bereich wachsen, zwischen 5,9 – 8,2 mit einem pH-Optimum von 7,2 [53]. *Mb. congolense* könnte ein vielversprechender Kandidat für eine industrielle Anwendung der EM sein, da dieser in unterschiedlichen Biogasanlagen vorkommt [54]. Elektroaktive Eigenschaften konnten bereits für diesen Organismus nachgewiesen werden [55].

Methanobacterium formicicum

Methanobacterium formicicum (*Mb. formicicum*) zählt zu den hydrogenotrophen Methanogenen und kann Formiat und CO₂ zu Methan metabolisieren. Das Archaeon kann mit Bakterien und Wimperntierchen eine endosymbiontische Lebensgemeinschaft eingehen [56–60]. *Mb. formicicum* ist ein nicht bewegliches, stäbchenförmiges Archaeon. Seine Form ändert sich mit dem Alter der Kultur von kurzen, gleichmäßigen Stäbchen zu langen, unregelmäßigen Stäbchen [56,61]. *Mb. formicicum* zeichnet sich durch eine hohe pH- und Temperaturtoleranz aus. Der pH-Bereich liegt zwischen 6,5 – 8,5 mit einem Optimum bei 7,6 und die Temperaturspanne erstreckt sich von 25 – 65 °C mit einem Optimum bei 43 °C [57–59,61–64]. Dieses Methanogen kann in den unterschiedlichsten Biogasanlagen vorkommen, insbesondere

in Biogasanlagen, welche als Substrat Futterrüben oder Gülle nutzen [65]. *Mb. formicicum* wurde bisher nur in Mischkulturen auf dessen elektroaktiven Eigenschaften hin untersucht [66].

Methanococcus maripaludis

Methanococcus maripaludis (*Mc. maripaludis*) ist ein hydrogenotrophes, methanogenes Archaeon, welches strikt anaerob und nicht beweglich ist. Die Durchschnittsgröße liegt zwischen 1,2 - 1,6 µm und es kann polymorphische Kokken bilden. Dieser mesophile Organismus hat ein breites Temperaturspektrum von 18 – 47 °C mit einem Optimum bei 38 °C. *Mc. maripaludis* kann bei einem pH-Wert zwischen 6,8 und 7,2 Formiat oder CO₂ zu Methan umsetzen. Für ein optimales Wachstum muss das Medium eine hohe Salinität aufweisen und mindestens 15 mmol/L Magnesium- und 100 mmol/L Natriumchlorid enthalten [67].

Das Archaeon *Mc. maripaludis* wird in der Elektrobiotechnologie gerne als ein Modellorganismus verwendet und wurde daher in der EM schon vielfach eingesetzt [55,68,69]

Wachstumsverhalten von ausgewählten methanogenen Archaeen

Die oben beschriebenen Methanogenen unterscheiden sich jeweils stark in den Wachstumsraten bzw. den Verdopplungszeiten. In der Tabelle 1 sind die Generationszeiten der genannten Methanogenen zusammengefasst. Die Methanogenen der Art *Mb. formicicum* haben mit etwa elf Stunden ein im Vergleich zu den anderen hier beschriebenen Methanogenen recht langsames Wachstum, während *Mc. maripaludis* mit nur zwei Stunden die geringste Verdopplungszeit hat.

Tabelle 1 Wachstums-Charakteristika für ausgewählte Methanogene [51,62,63]

Spezies	Wachstumsrate	Dopplungszeit	Morphologie
<i>Methanobacterium formicicum</i>	0,08 h ⁻¹	11 h	Stäbchen
<i>Methanobacterium congolense</i>	0,09 h ⁻¹	8 h	Stäbchen
<i>Methanosarcina barkeri</i>	0,10 h ⁻¹	7 h	Irreguläre Kokken
<i>Methanococcus maripaludis</i>	0,35 h ⁻¹	2 h	Kokken

2.2.3 Elektronentransfer

Eine einstufige EM, bei der ein direkter Elektronentransfer stattfindet, wird direkte EM genannt. Bei einer zweistufigen EM, der indirekten EM, wird Wasserstoff zunächst an der Elektrode gebildet und anschließend durch die Methanogenen aufgenommen und verstoffwechselt.

Der extrazelluläre Elektronentransfer (EET) beschreibt den Elektronentransfer zwischen einer Elektrode und einem Mikroorganismus oder zwischen verschiedenen Mikroorganismen. Dabei werden Elektronendonoren und -akzeptoren an der jeweiligen Zellmembran genutzt. Elektroaktive Mikroorganismen können Elektronen „empfangen“ oder „abgeben“. Dabei werden Mikroorganismen elektrogen genannt, wenn diese Organismen Elektronen an eine positiv geladene Elektrode (Anode) abgeben. Elektrotrophe Mikroorganismen dagegen empfangen Elektronen von einer negativ geladenen Elektrode (Kathode) [4].

Der Elektronentransport kann durch Mediatoren (z. B. Phenazinderivate), Enzyme (z. B. Ni-Fe-Hydrogenasen) und/oder e-Pili/Nanowires stattfinden. Des Weiteren ist der Mechanismus des EET abhängig von den Redoxpotentialen des Metabolismus, welcher die Elektronen zur Verfügung stellt. Diese elektroaktiven Transportmoleküle werden nicht von der Zelle verstoffwechselt [45,70–76]. Neben dem Transport der Elektronen über verschiedene Mediatoren, können die Elektronen ebenfalls über Wasserstoff oder Formiat transportiert werden [47].

2.2.4 Bioelektrochemische Systeme

Die bioelektronischen Systeme (Bioelectrochemical Systems, BES) sind Systeme, die innerhalb der Elektrobiotechnologie und somit ebenfalls für die EM genutzt werden, siehe Abbildung 3 [76,77]. In diesen Systemen findet an der Anode die Oxidation und an der Kathode die Reduktion statt, siehe Abbildung 3 [4].

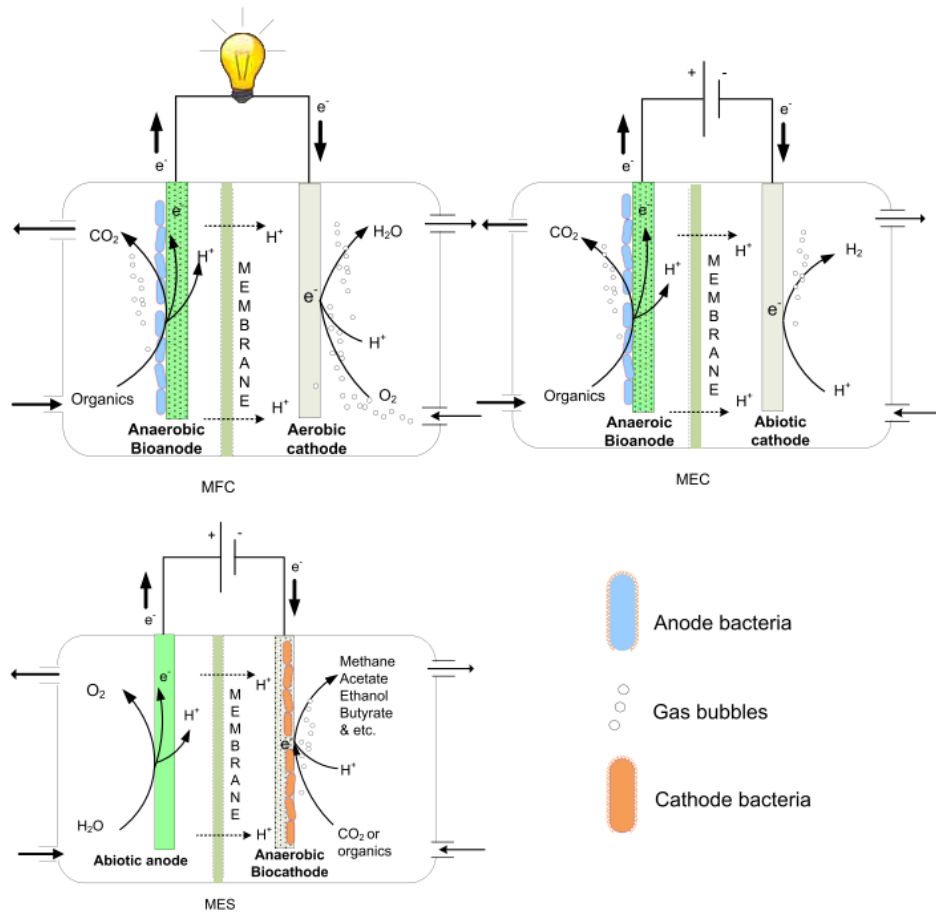


Abbildung 3 Untergliederung der Elektrobiotechnologie je nach Anwendungsgebiet, MFC – Microbial Fuel Cell, MEC – Microbial Electrolysis Cell und MES - Microbial ElectroSynthesis, unverändert entnommen von [4]

BES können in zwei verschiedene Kompartimente unterteilt werden: in das der Aufnahme und in das der Abgabe von Elektronen. Bei einer Microbial Fuel Cell (MFC) werden Elektronen innerhalb der Anodenkammer durch die Oxidation erzeugt. Dabei wird ein organisches Substrat gespalten, welches die Elektronen an die Elektrode (Anode) abgibt. Diese Technologie wird z. B. bei der Abwasserreinigung angewendet [78].

Bei einer Microbial ElectroSynthesis (MES) werden innerhalb der Kathodenkammer die zur Verfügung stehenden Elektronen genutzt, um z. B. Methan (Power-to-Gas) oder Grundchemikalien zu erzeugen [4,46,79–82]. Eine Anwendung der MES ist die Elektromethanogenese, bei welcher CO_2 und elektrolytisch erzeugter Wasserstoff in Methan umgesetzt wird.

Die Microbial Electrolysis Cell (MEC) ist ähnlich zu einer MFC, allerdings ist bei dieser die angelegte Spannung höher. Somit wird gezielt Wasserstoff auf der Kathodenseite produziert [72,73,83,84]. Die MEC könnte dazu genutzt werden, um auf der Anodenseite organische Substrate abzubauen und auf der Kathodenseite Methan zu produzieren.

Diese verschiedenen Anwendungsgebiete der beschriebenen bioelektrochemischen Systeme können in zwei unterschiedliche Arten an Reaktoren betrieben werden: den Einzelgefäßsystemen, Single-Chamber, und den zweigeteilten Systemen, Two-Chamber. Diese werden in den nachfolgenden Kapiteln kurz beschrieben.

2.2.4.1 Single-Chamber

Das Single-Chamber System wird genutzt, wenn die Kathoden- (Wasserstofferzeugung) und die Anodenreaktion (Sauerstofferzeugung) auf die jeweiligen Mikroorganismen und die Prozesseffizienz keinen negativen Einfluss hat [85].

2.2.4.2 Two-Chamber

Das Two-Chamber System wird genutzt, wenn zwei verschiedene Reaktionen gleichzeitig ablaufen, bei der die Reaktionsprodukte die jeweilig andere Reaktion beeinflussen. In einem Two-Chamber System sind daher die Reaktionen räumlich getrennt [86,87]. Die einzelnen Kompartimente werden durch eine Ionenaustauscher-Membran separiert, um den elektrischen Fluss zu garantieren (Abbildung 4) [88]. Die typische Form besteht aus zwei Zylindern, welche über einen Flansch verbunden sind. Da dieser Reaktoraufbau an den Buchstaben H erinnert, werden diese Systeme als H-Zellen bezeichnet [89]. Alternativ existieren ebenfalls Systeme in denen eine Salzbrücke verwendet wird (grafisch nicht dargestellt) [90].

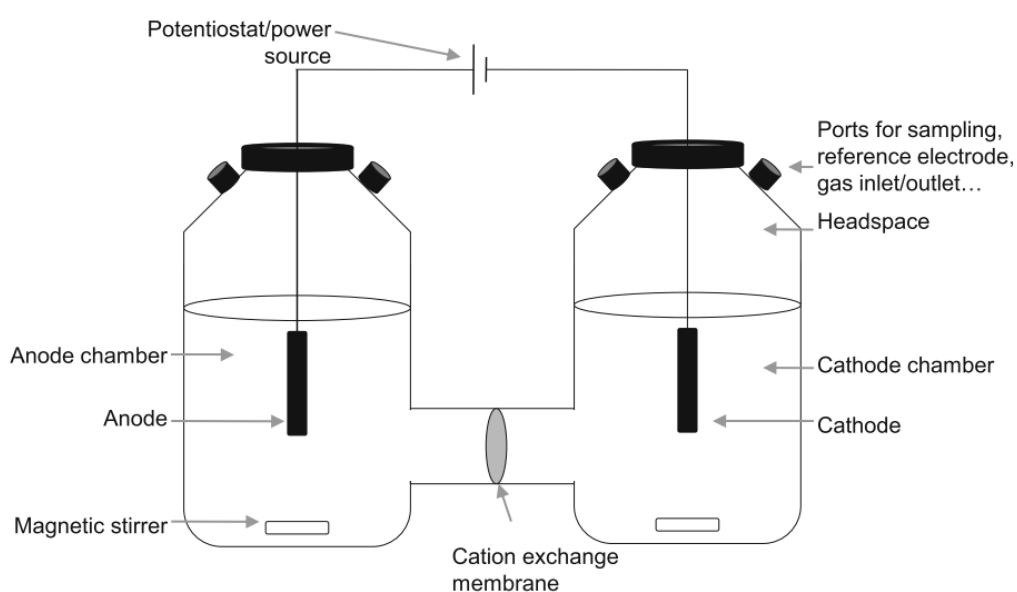


Abbildung 4 Schematischer Aufbau eines Two-Chamber Reaktors, auch H-Zelle genannt, unverändert entnommen von [89]

Die H-Zelle ist ein beliebter Reaktor, welcher von vielen Arbeitsgruppen verwendet wurde und zur Grundlagenforschung immer noch verwendet wird [90–92]. Dieser einfache Aufbau hat jedoch verschiedene negative Eigenschaften. Zu einem ist der Abstand zwischen den Elektroden sehr groß, welches den inneren Widerstand (Ohm'scher Widerstand) erhöht. Des Weiteren hindert die kleine Membranoberfläche zwischen den beiden Kompartimenten den möglichst freien Elektronenfluss. Somit ist eine Durchmischung innerhalb der Halbzellen durch Rühren nur begrenzt möglich. [36]. Neben diesen genannten Punkten ist es zudem schwierig, verschiedene Ergebnisse unterschiedlicher Publikationen miteinander zu vergleichen, da nicht immer der Aufbau einer H-Zelle eindeutig beschrieben ist und bisher keine einheitlichen Reaktoren verwendet wurden bzw. kommerziell erwerblich sind [93].

2.2.4.3 Elektrochemische Arbeitsweisen

Bioelektrochemische Systeme nutzen prinzipiell den gleichen Aufbau einer elektrochemischen Zelle wie in der Elektrochemie. Eine solche elektrochemische Zelle besteht hauptsächlich aus fünf Komponenten: Elektroden (Kathode, Anode), Elektrolyt, elektrischer Leiter (Verbindung der Elektroden), Separator und Gehäuse. Der Separator wird eingesetzt, wenn der Kathoden- und Anodenraum nicht durchmischt werden sollen [88]. Dieser besteht zumeist aus einer Ionenaustauscher-Membran oder vereinzelt aus einem Diaphragma oder einer Salzbrücke [73,94,95].

Der *Elektrolyt* ist ein ionischer Leiter und ist meist eine wässrige Lösung in denen verschiedenen Salze gelöst sind. Innerhalb dieser Zelle fließen die positiv geladenen Teilchen (Kationen) zu der negativen Elektrode und die negativ geladenen Teilchen (Anionen) zu der positiven Elektrode. Des Weiteren wird unterschieden zwischen einer galvanischen Zelle und einer elektrolytischen Zelle. In einer *galvanischen Zelle* laufen die elektrochemischen Reaktionen freiwillig bzw. spontan ab und die Elektronen fließen von der Anode (negative Ladung) zur Kathode (positive Ladung). Dabei wird chemische Energie in elektrische Energie umgewandelt. In der *elektrolytischen Zelle* wird eine elektrochemische Reaktion durch eine externe Spannung erzwungen bzw. bevorzugt (*Elektrolyse*). Dabei fließen die Elektroden von der Anode (positive Ladung) zur Kathode (negativen Ladung), siehe Abbildung 5. In der Elektrobiotechnologie wird dieses Prinzip genutzt um Wasserstoff oder Grundchemikalien wie Methan zu erzeugen [73,94,95].

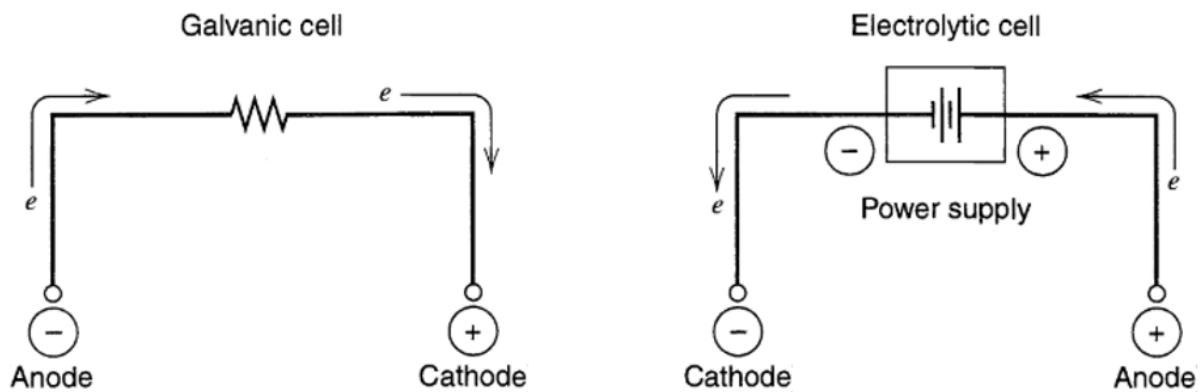


Abbildung 5 Grundaufbau einer galvanischen und elektrolytischen Zelle, unverändert entnommen von [94]

2.2.5 Membranen

Bei der Wahl des Separators zwischen den Kompartimenten von Two-Chamber Systemen werden häufig Membranen verwendet. Die zumeist genutzte Membran ist die Nafion™ Membran N117 [35,96,97]. Diese besteht aus einem Perfluorsulfonsäure-Polymer und zeichnet sich durch chemische und thermische Stabilität aus. Des Weiteren besitzt diese Membran eine Kationen- und Protonenselektivität. Dadurch ist diese Membran besonders für verschiedene BES-Systeme geeignet [98].

Mukaddam *et al.* 2016 untersuchte die Gaspermeabilität der Nafion-Membran im trockenen Zustand. Hierbei zeigte diese Membran eine Permeabilität, insbesondere für kleine Gasmoleküle wie H₂, He, CO₂, O₂, N₂ und CH₄. Größere organische Gase werden durch die Membran nahezu vollständig zurückgehalten [99]. Weitere Untersuchungen zeigten, dass eine vollständig protonierte Membran ebenfalls gaspermeabel ist. Somit können bei längerer Versuchsdauer die Kompartimente mit den Gasen des jeweiligen anderen Kompartiments, z. B. Sauerstoff auf der Kathodenseite, „vergiftet“ werden [98,99].

2.2.6 Versauerung und Alkalisierung der H-Zelle

Mikroorganismen benötigen für ihr Wachstum bestimmte Bedingungen, hierzu zählen z. B. Medienbestandteile, Temperatur und der pH-Wert. Für die Regulierung des pH-Wertes auf einen konstanten Wert hin werden verschiedene Methoden genutzt z. B. Puffersysteme oder Säuren- bzw. Basenzugaben. Ebenso kann die Zugabe von CO₂ durch die Bildung von Kohlensäure den pH-Wert beeinflussen. Zudem beeinflusst die Elektrolyse in den jeweiligen Kammern eines Zwei-Kammer-Systems den pH-Wert. Die Anodenseite wird durch die

Spaltung von Wasser in Protonen und Sauerstoff angesäuert und auf der Kathodenseite werden Hydroxid-Ionen gebildet, welche den pH-Wert erhöhen, siehe Abbildung 6 [46,100–103]. Für die Messung des pH-Wertes in BES können standardisierte pH-Elektroden verwendet werden, welche durch die Messung der internen Spannungsdifferenz den pH-Wert berechnen. Bedingt durch die interne Spannungsmessung könnte davon ausgegangen werden, dass die Messung innerhalb eines elektrochemischen Versuches beeinträchtigt werden kann. Jedoch zeigten Krieg *et al.* 2018 in ihrer Arbeit, dass in einem Spannungsbereich von -800 mV bis +800 mV die angelegte Spannung keinen wesentlichen Einfluss auf die pH-Wert Messung hat und somit einfache pH-Elektroden in unterschiedlichen bioelektrochemischen Versuchen genutzt werden können [104].

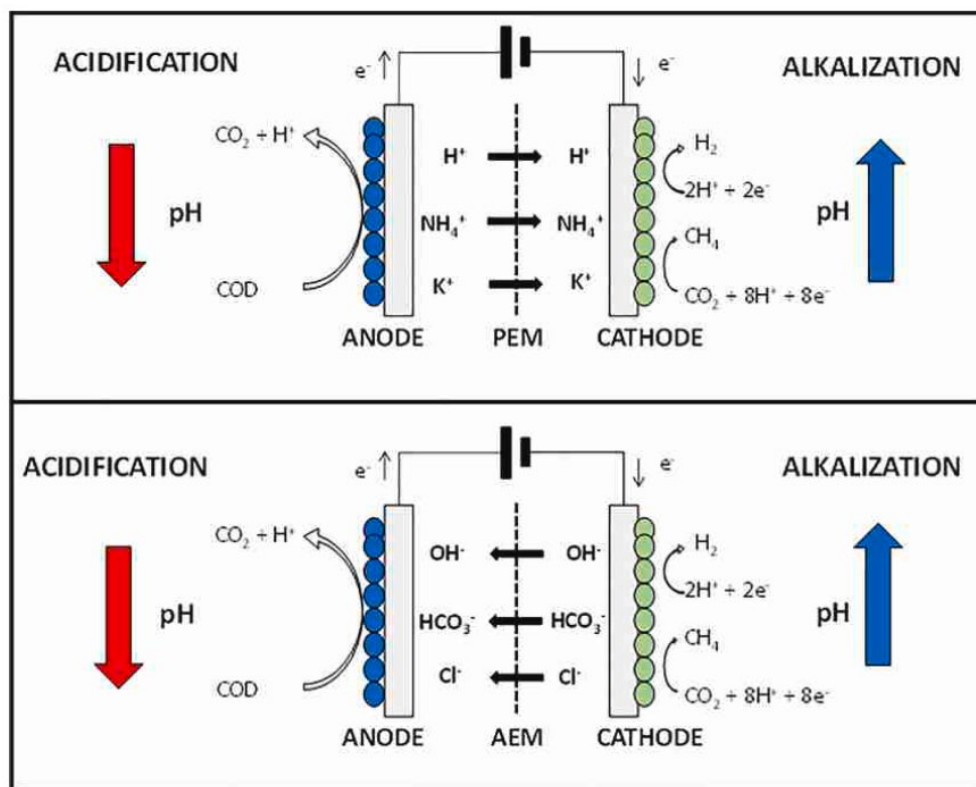


Abbildung 6 Prinzipieller Ablauf der Versauerung und Alkalisierung der H-Zelle, unverändert entnommen von [100]

2.3 Elektrochemie

Die Elektrochemie ist eine interdisziplinäre Naturwissenschaft, welche in die physikalische Chemie eingeordnet ist. Die Elektrochemie beschäftigt sich mit den physikalisch-chemischen Phänomenen an der Phasengrenze zwischen der Elektrode und dem Elektrolyten. Grundlage dieser Reaktionen sind Redox-Reaktionen, wobei die Elektronen nicht direkt von einem Elektronenakzeptor auf einen Elektronendonator übertragen werden, sondern über einen elektrischen Leiter. Die Reduktions- und Oxidationsreaktionen finden in den jeweiligen Halbzellen statt [94]. Die Prinzipien der Elektrochemie werden in den bioelektrochemischen Systemen genutzt, um biologische Prozesse zu begünstigen, z. B. die Methanproduktion in der Elektromethanogenese.

2.3.1 Redoxreaktionen

Alle ablaufenden Reaktionen können auf einen Elektronenfluss zurückgeführt werden, in dem Elektronen von einer Komponente zur andere übertragen werden. Dieses Phänomen wird als *elektromotorische Kraft* (electromotive force, Zellspannung) bezeichnet. In chemischen Reaktionen werden diese Elektronenflüsse in Redoxreaktionen beschrieben. Innerhalb dieser Reaktionen wird die *Reduktion*, die Aufnahme von Elektronen, und die *Oxidation*, die Abgabe von Elektronen, untersucht [105]. Charakteristisch für die Reaktionen sind die Standardelektronenpotentiale E^0 , welche die elektrochemische Reaktion im thermodynamischen Gleichgewicht beschreiben, siehe Tabelle 2 [105]. Für die Methanogenese muss ein Potential von unter $E^0 = -244$ mV angelegt werden, damit Methan produziert werden kann. Im Fall der Bildung von Wasserstoff muss ein Potential von mind. -410 mV überwunden werden.

Tabelle 2 Redoxpotentiale von verschiedenen Reaktionen bei pH = 7 [5,39,80,84,106–108]

Redoxpaar	E^0 in mV	Elektronen
O₂/H₂O	820	4
NO₃⁻	750	5
O₂/H₂O₂	280	2
HCO₃⁻/CH₄	-244	8
HCO₃⁻/CH₃COOCH	-280	8
H⁺/H₂	-410	2

2.3.2 Elektrochemische Arbeitsweisen

In der Regel wird ein drei-Elektroden-Aufbau verwendet, mit einer Arbeitselektrode (AE), einer Gegenelektrode (GE) und einer Referenzelektrode (RE) [94,95,109]. Die Arbeitselektrode ist laut der IUPAC die Kathode und die Gegenelektrode die Anode [110]. Die Referenzelektrode ist mit einem hohem Widerstand angeschlossen und ist somit fast stromlos und dient lediglich zur Überprüfung der angelegten Spannung [94]. Bei der Auswahl der Elektroden sollten zwei Punkte beachtet werden: Die RE sollte ein stabiles Potential aufweisen und der Nernst-Gleichung unterliegen.

In der Elektrochemie gibt es zwei verschiedene Elektrodenarten. Eine Normalwasserstoffelektrode/Standardwasserstoffelektrode (NHE/SHE) ist die Elektrode, an welcher alle Standardpotentiale gemessen werden. Das Standardpotential wird mit 0,0 V definiert. Des Weiteren gibt es Elektroden der 2. Art (z. B. Kalomel - oder Ag/AgCl Elektroden), welche mit einem schwerlöslichen Salz wie Silberchlorid (AgCl) oder Kalomel (Hg₂Cl₂) versehen sind. Die Handhabung solcher Elektroden ist einfach und weit verbreitet in der Elektrochemie. Allgemein gilt: die RE sollte so nah wie möglich an der WE angebracht sein, um einen Spannungsabfall zu minimieren, welcher Ohm'scher Spannungsabfall oder auch Ohm'scher Widerstand genannt wird [95,111].

Die Beschaffenheit der anderen beiden Elektroden (AE und GE) hängt von dem jeweiligen Experiment ab. Jedoch werden meist Elektroden aus Platin, Titan oder Graphit/Carbon verwendet, da die Werkstoffe eine sehr hohe Leitfähigkeit aufweisen und chemisch inert sind [88,112]. Platinelektroden sind im Vergleich zu Elektroden aus Kohlenstoff sehr teuer [113]. Aus diesem Grund werden in der Elektrobiotechnologie hauptsächlich Kohlenstoffelektroden verwendet. Ein weiterer Vorteil der Graphitelektroden ist deren poröse Oberfläche, an der sich Mikroorganismen gut anheften können [89,94].

Der wichtigste Punkt für den Aufbau einer Elektrolyse-Zelle ist der Abstand zwischen der AE und der GE, da zwischen diesen Elektroden der Strom fließt. Diese Elektroden sollten so nah wie möglich und ohne Hindernisse aufgebaut werden. Dadurch werden die Elektronen im elektrischen Feld direkt von einer Elektrode zur anderen geführt, wodurch eine hohe Stromdichte und ein geringer Spannungsabfall entstehen [95,114].

2.3.3 Faraday'sche und nicht Faraday'sche Prozesse

In der Elektrochemie kann zwischen den Faraday'schen und nicht Faraday'schen Prozessen unterschieden werden. Ein nicht Faraday'scher Prozess beschreibt dabei eine Galvanische

Zelle, in welcher die elektrochemische Reaktion spontan abläuft. Dabei kann die Entladung sowie die Bildung einer elektrochemischen Doppelschicht beobachtet werden [115,116].

Eine Elektrolysezelle funktioniert nach dem Prinzip eines Faraday'schen Prozesses. Innerhalb dieser Prozesse wird eine elektrochemische Reaktion durch das Anlegen einer bestimmten Spannung erzwungen bzw. begünstigt. Dabei gilt ein direkter proportionaler Zusammenhang zwischen dem geflossenen Strom und der Umsatzrate der Elektrodenreaktion, d.h. je höher der Stromfluss, desto höher ist die Umsatzrate. Bei einem anodischen Prozess werden positive Ströme und bei einem kathodischen Prozess werden negative Ströme bestimmt [115,116]. Bei einer MFC werden hauptsächlich positive Ströme gemessen. Bei der MES, z.B. Elektromethanogenese, werden hauptsächlich negative Ströme bestimmt. Diese Ströme werden für die Bilanzierung der jeweiligen Prozesse genutzt.

2.3.4 Chronoamperometrie

In der Amperometrie wird der Elektronenfluss an der Arbeitselektrode gemessen. Dabei wird für die gesamte Reaktion ein konstantes Potential angelegt. In der Chronoamperometrie wird über einen bestimmten Zeitraum der Elektronenfluss gemessen, welcher benötigt wird, um das Potential aufrechtzuerhalten. Mittels der Referenzelektrode wird ein Potential konstant gehalten. Bei einer Abweichung des Potentials wird dieses durch den Potentiostaten nachgeregelt [70,94].

Dieses Messprinzip wird in bioelektrochemischen Systemen für die Bilanzierung des jeweiligen Prozesses genutzt. Dabei spiegelt die gemessene elektrische Ladung die theoretische, maximale Ausbeute des jeweiligen Produktes z. B. Methan wieder [94].

2.3.5 Bilanzierung von bioelektrochemischen Systemen

Für die Bilanzierung von BES, vor allem bei der MEC und der MES, können ähnliche Berechnungsansätze wie für einen Elektrolyseur genutzt werden. Bei der Bilanzierung über die Spannungseffizienz wird der Quotienten der thermoneutralen Zellspannung (Entropieänderung durch Wärme bei 1,48 V DC) und realer Zellspannung (Verlust von katalytischen und elektrolytisch Reaktion in der DC Zelle) berechnet. Bei der DC- Effizienz (DC-direct current = Gleichstrom) wird das Verhältnis zwischen technisch nutzbaren Wasserstoff und der benötigten Leistung eines Stacks betrachtet. Für die Bestimmung der Anlagen-Effizienz wird die produzierte Menge an Wasserstoff gegen alle möglichen Verluste (z.B. AC/DC Umwandlung,

Wasseraufbereitung, Kühlsystem etc.) innerhalb einer Systemgrenze ins Verhältnis gebracht [117,118].

Die Faraday'sche bzw. Coulombsche Effizienz beschreibt das Verhältnis zwischen dem real nutzbaren/erzeugten Wasserstoff und der maximalen möglichen Wasserstoffausbeute. Bei dieser Effizienzberechnung sind u.a. Diffusionsverluste durch die Membran oder elektrische Verlustströme mit einbezogen [117,118]. Die Faraday'sche Effizienz beruht dabei auf dem ersten Faraday'schen Gesetz, welches den proportionalen Zusammenhang zwischen der gebildeten Stoffmenge einer Substanz an der Elektrode zu der benötigten elektrischen Ladung (Coulomb) beschreibt [94]. In dieser Arbeit wird hauptsächlich der Begriff der Coulombsche Effizienz (CE) verwendet, da dies die meist verwendete Beschreibung der Effizienz ist [13,35,88].

3 Zielsetzung der Doktorarbeit

Die Elektromethanogenese kann eine alternative Speichermöglichkeit zu konventionellen Batterien darstellen [7]. Verschiedene Forschungsgruppen nutzen zur Klärung von stofflichen und kinetischen Fragestellungen der Elektromethanogenese unterschiedliche Spannungen und Mikroorganismen, zumeist in Mischkulturen, siehe Tabelle 3. Hierfür werden hauptsächlich Spannungen von unter -410 mV vs. SHE untersucht. Bei diesen Spannungsbereichen kann abiotisch Wasserstoff an der Kathode entstehen. Dieser Wasserstoff kann von den jeweiligen Methanogenen aufgenommen und verstoffwechselt werden.

Tabelle 3 Literaturübersicht über die erfolgten Forschungsergebnisse im Bereich der Elektromethanogenese bezüglich des Einflusses der abiotischen Wasserstoffproduktion innerhalb der Prozesse

Kulturbestandteile	Medium	Spannungen vs. Standard H ₂ -Elektrode	Quelle
Gärschlamm einer Biogasanlage	Minimalmedium mit Essigsäure	-600 und -800 mV	[119]
Gärschlamm einer Biogasanlage	Minimalmedium	-850 mV	[120]
<i>Methanobacterium palustre</i>	Minimalmedium mit Acetat	-900 bis -1400 mV	[35]
Gärschlamm einer Biogasanlage	Minimalmedium	-650 bis -900 mV	[121]
<i>Methanococcus maripaludis</i>	Minimalmedium	-600 und -700 mV	[122]
Anreicherungskultur von Brackwassersedimenten	Minimalmedium	-250 bis 750 mV	[123]
Klärschlamm einer kommunalen Kläranlage	Minimalmedium	-360 und -660 mV	[124]

In dieser Arbeit sollen für eine genaue Untersuchung bzw. Beschreibung der Elektromethanogenese drei grundlegende Fragen beantwortet werden.

Die erste Frage zur Etablierung von gut geeigneten Mikroorganismen für die Elektromethanogenese bezieht sich auf die Isolation und Charakterisierung von Methanogenen:

1) Ist es möglich, Methanogene mittels Anlegens einer Spannung zu isolieren, die leistungstärkere Methanbildner als die entsprechenden Reinkulturen für die Elektromethanogenese darstellen?

Für die Beantwortung wurden verschiedene Schlämme von Biogasproben gesammelt. Anschließend erfolgte ausgehend von diesen Proben eine Isolation über die „Dilution-to-Extinction“ Methode. Parallel wurde eine Isolation über das Anlegen einer Spannung durchgeführt. Dadurch sollte die Wahrscheinlichkeit erhöht werden, gezielt elektroaktive Methanogene zu isolieren. Ziel dieser Isolationen war es, Methanogene zu finden, welche bessere Effizienzen erreichen als bereits genutzte Methanogene in Systemen der Elektromethanogenese.

Die zweite Frage dient der Klärung der Unterscheidung zwischen direkter und indirekter Elektromethanogenese.

2) Ist Wasserstoff essenziell für die Elektromethanogenese oder reichen Protonen und Elektronen für eine effektive Methanproduktion aus?

Hierfür wurden verschiedene Spannungsbereiche untersucht. Zum einen wurden Spannungen ausgewählt, in welchen Wasserstoff elektrolytisch produziert wurde, also eine indirekte Elektromethanogenese vorlag. Zum anderen wurden Spannungen genutzt, in denen kein Wasserstoff abiotisch entstehen konnte, also eine direkte Elektromethanogenese stattfinden konnte.

Die dritte Frage bezieht sich auf die Steuerung der Elektromethanogenese in den späteren Anwendungen.

3) Ist es möglich, die Elektromethanogenese unter intermittierenden Potentialen zu betreiben?

Für die Beantwortung der dritten Frage wurde der Tag-Nacht-Rhythmus einer Photovoltaikanlage simuliert. Hierfür wurde der jeweilige Versuchsaufbau der Elektromethanogenese im Wechsel 12 Stunden lang mit einem Potential versorgt, in der eine ausreichend hohe Methanproduktion stattfinden konnte. Anschließend wurde 12 Stunden ein Potential angelegt, in welchem die Elektromethanogenese nicht begünstigt wurde. Somit sollte geklärt werden, ob die Elektromethanogenese für eine spätere industrielle Anwendung unter den Bedingungen einer intermittierenden Stromversorgung (z. B. Tag-Nacht-Rhythmus) mit einer ausreichend hohen Methanproduktionsrate geeignet sein kann.

4 Material und Methoden

Die Chemikalien wurden von den folgenden Lieferanten bezogen: AppliChem (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Dr. Paul Lohmann (Lüneburg), Fluka jetzt Honeywell (Offenbach am Main), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Sigma Aldrich (Deisenhof) und Th. Geyer (Renningen). Die Fütterungsgase wurden von Westfalen (Münster) bezogen und die Prüfgase von Linde (Pullach).

Standardlaborgeräte wie Inkubatoren, Wasserbäder, Vakuumpumpe, Zentrifugen, UV/VIS Spektrometer, Spannungsversorgung, Geldokumentationssystem und ein PCR-Zykler wurden von den folgenden Herstellern bezogen: Binder (Tuttlingen), Memmert (Schwabach), Julabo (Seelbach), Leybold (Köln), Eppendorf (Hamburg), Thermo Scientific (Schwerte), Aary Electronic (Taiwan), Nippon (Düren), VWR (Erlangen) und Analytik Jena (Jena).

4.1 Medien

4.1.1 Minimalmedien

Archaeen sind Mikroorganismen, die an besondere Umweltbedingungen angepasst sind und vielfach in verschiedenen extremen Lebensräumen leben können [28]. Hydrogenotrophe Methanogene sind anaerobe Mikroorganismen, welche an dem finalen Schritt des anaeroben Kohlenstoffkreislaufes beteiligt sind. Diese Archaeen nutzen eine spezielle Ausstattung von Enzymen und Coenzymen, welche zur Energiegewinnung dienen [24,25,125]. Für die Anzucht unter Laborbedingungen müssen aus diesem Grund spezielle Medien genutzt werden. In dieser Arbeit wurden zwei Minimalmedien verwendet, siehe Tabelle 4 bis Tabelle 15 und das Pipettierschema in Tabelle 14. Das verwendete HAW-Medium wurde von Prof. em. Dr. Scherer empfohlen, da dieses speziell an methanogenen Archaeen angepasst war [126,127]. Das HAW-Medium wurde zu Zwecken der klassischen Kultivierung und zur Isolierung von Methanogenen eingesetzt. Es konnte jedoch nicht für die elektrochemischen Versuche verwendet werden, da es ein zu großen Grundrauschen verursachte. Für die elektrochemischen Versuche wurde deshalb das minimalisierte Medium M141 ohne Hefeextrakt und Pepton eingesetzt, da dieses Medium bereits in elektrochemischen Experimenten genutzt wurde und stabile Versuchsbedingungen ermöglichte [55].

Tabelle 4 Macroelementlösung des HAW-Minimalmediums auf 1 L, pH 7,6

	M in g/mol	m in g
MgCl₂ x 6 H₂O	203,30	0,2
NaCl	58,44	1,8
NH₄Cl	53,49	1,0
KCl	74,55	4,8
CaCl₂ x 6 H₂O	219,09	0,1

Tabelle 5 Spurenelementlösung des HAW-Minimalmediums auf 1 L, pH 7,6

	M in g/mol	m in mg
(NaPO₃)_x	101,96	10,0 g
ZnCl₂	136,28	136,3
MnCl₂ x 4 H₂O	197,91	19,8
H₃BO₃	61,83	0,6
CuCl₂ x 2 H₂O	170,48	34,0
Na₂WO₄ x 2 H₂O	329,86	33,0
CoCl₂ x 6 H₂O	237,93	71,3
NiCl₂ x 6 H₂O	237,71	71,3
Na₂SeO₃ x 5 H₂O	263,01	52,6
Na₂MoO₄ x 2 H₂O	241,45	24,1
Fe-(III)-Cl₂ x H₂O	270,30	540,0

Tabelle 6 Makroelementlösung des 141 Mediums ad 1L auf pH 7,2 einstellen

	M in g/mol	m in g
KCl	74,55	0,35
MgCl₂ x 6 H₂O	203,30	4,00
MgSO₄ x 7 H₂O	246,48	3,45
NH₄Cl	53,49	0,25
CaCl₂ x 2 H₂O	147,02	0,14
K₂PO₄	174,20	0,14
Fe(NH₄)₂SO₄ x 6 H₂O	394,14	0,002
NaCl	58,44	18,00
MOPS-Puffer	209,26	20,90
NaHCO₃	84,01	5,00

Tabelle 7 Spurenelementlösung des 141 Mediums ad 1 L, pH 7,6

	M in g/mol	m in g
Triplex I	191,14	1,50
MgSO₄ x 7 H₂O	246,48	3,00
MnSO₄ x H₂O	169,02	0,50
NaCl	58,44	1,00
FeSO₄ x 7 H₂O	278,01	0,10
CoSO₄ x 7 H₂O	281,10	0,18
ZnSO₄ x 7 H₂O	287,56	0,18
CuSO₄ x 5 H₂O	249,69	0,01
AlK(SO₄) x 12 H₂O	474,39	0,02
H₃BO₃	61,83	0,01
Na₂MoO₄ x H₂O	241,95	0,01
NiCl₂ x H₂O	129,59	0,03
Na₂SeO₃ x 5 H₂O	263,01	0,3 mg
Na₂WO₄ x H₂O	241,21	0,4 mg

Tabelle 8 Vitaminlösung der Minimalmedien ad 0,5 L

	M in g/mol	m in mg
Biotin	244,30	1,0
Folsäure	441,41	1,0
Pyridoxinhydrochlorid	205,64	5,0
Riboflavin	376,37	2,5
Thiamin-HCl	337,27	2,5
Nicotin Säure	123,11	2,5
D-Ca Pantothenate	476,54	2,5
Vitamin B12	1355,4	0,1
p-Aminobenzoessäure	137,14	2,5
Liponsäure	206,33	2,5

Tabelle 9 Resazurinlösung ad 0,1 L

	M in g/mol	m in mg
Resazurin	257,17	100,0

Tabelle 10 Imidazolösung ad 0,1 L, pH 7,6

	M in g/mol	m in mg
Imidazol	68,08	13,6
25 %ige HCl	36,55	6 mL

Tabelle 11 Eisen-Cysteinlösung ad 0,05 L

	M in g/mol	m in g
Cystein-HCl Monohydrat	175,64	1,87
Fe-(II)-Citrat	245,95	0,06

Tabelle 12 Natriumsulfidlösung ad 0,01 L

	M in g/mol	m in g
Na₂S x H₂O	96,08	0,12

Tabelle 13 Titancitratlösung ad 0,05 L

	M in g/mol	m in g
Tri-Na-Citrat x H₂O	294,10	2,94
15%iges Titan-III-chlorid	154,26	5 mL

Tabelle 14 Pipettierschema für die Herstellung des HAW-Minimalmediums

Volumina	Lösungen
10 mL	Imidazolösung
10 mL	Spurenelementlösung
2 mL	Resazurinlösung
961 mL	Makroelementlösung
pH = 7,2 mit 1 M HCL, anaerobisieren, autoklavieren	
10 mL	Vitaminlösung
2 mL	Eisen-Cysteinlösung
2 mL	Natriumsulfidlösung
1 mL	Titancitratlösung
1000 mL	Gesamtvolumen

Tabelle 15 Pipettierschema für die Herstellung des 141 Minimalmediums

Volumina	Lösungen
10 mL	Spurenelementlösung
980 mL	Makroelementlösung
<u>990 mL</u>	<u>Gesamtvolumen</u>
pH = 7,2 mit 1 M HCL, Anaerobisieren, Autoklavieren	
10 mL	Vitaminlösung
2 mL	Eisen-Cysteinlösung
2 mL	Natriumsulfidlösung
1 mL	Titancitratlösung
1005 mL	Gesamtvolumen

4.1.2 Weitere Medien und Lösungen

Die folgenden Medien wurden für die Isolierung der Methanogenen verwendet.

Tabelle 16 Synthetisches Harnstoffmedium nach Nazari et al. 2020 [128]; ad 1 L; pH 7,6

	M in g/mol	m in g
NH₄Cl	53,49	10,00
Harnstoff	60,06	7,70
KH₂PO₄	136,09	0,74
NaCl	58,44	2,60
KCl	74,55	2,20
CaCl₂ x H₂O	129,00	0,01
MgCl₂ x 6 H₂O	203,30	0,10

Tabelle 17 Überarbeitetes Medium 120c von der DSMZ ad 1,0 L

	M in g/mol	m in g
K₂HPO₄	174,20	0,35
KH₂PO₄	136,09	0,23
NH₄Cl	53,49	0,50
MgSO₄ x 7 H₂O	203,30	0,50
CaCl₂ x H₂O	129,00	0,25
NaCl	58,44	2,25
FeSO₄ x 7 H₂O 0,1 % w/v in 0,1 M H₂SO₄		2 mL
Spurenelemente (siehe Tabelle 5)		1 mL
Resazurin (0,1 % w/v)		0,5 mL
Vitaminlösung (siehe Tabelle 8)		10 mL

Tabelle 18 PBS Lösung ad 1,0 L nach [129]

	M in g/mol	m in g
NaCl	58,44	8,0
KCl	74,55	0,2
Na₂HPO₄ x 2 H₂O	177,99	1,8
KH₂PO₄	136,08	0,3

4.1.3 Antibiotika

In der Tabelle 19 sind die verwendeten Antibiotika aufgelistet. Die Antibiotika wurden ausgewählt, da diese auf die Protein- bzw. Zellwand von bakteriellen Zellen wirken und Archaeen relativ unempfindlich gegen diese Wirkstoffe sind [17].

Tabelle 19 Verwendete Antibiotika

	Zielort	M in g/mol	mg pro mL (Stocklösung)
Ampicillin	Zellwand	371,4	500
Bacitracin	Zellwand	1422	100
Kanamycin	Proteinsynthese	582,6	150
Nalidixinsäure	Proteinsynthese	232,2	250
Streptomycin	Proteinsynthese	1457	50
Vancomycin	Zellwand	1485	100

4.2 Kultivierung von Anaerobiern

Methanogene Archaeen sind sensibel gegenüber Sauerstoff [35,90,130–134]. Daher wurden alle Kulturen unter strikt anaeroben Bedingungen kultiviert. Für die Anaerobisierung von leeren Kulturgefäßen wurde zunächst über eine Injektionsnadel und mittels einer Vakuumpumpe die vorhandene Luft aus dem Gefäß entzogen. Anschließend wurde durch manuelles Umschalten eines Kugelhahnventils Stickstoff, mit einem Druck von 2 bar_{relativ} für ca. 3 s zu den Kulturgefäßen hinzugefügt. Dieser Vorgang wurde 3-mal wiederholt. Für die Anaerobisierung von Flüssigmedien wurde zunächst der gelöste Sauerstoff dem Medium entzogen. Aus diesem Grund wurde das Medium mittels eines Magnetrührers und eines „Rührfisches“ gerührt und ein Vakuum angelegt. Durch das Erzeugen eines Vakuums geht der gelöste Sauerstoff leichter in

die Gasphase über. Dieser Vorgang wurde für 20 s durchgeführt. Anschließend wurde Stickstoff, wie oben beschrieben, dazugegeben. Dieser Vorgang wurde 10-mal wiederholt.

Leere und die mit Medium gefüllten Kulturgefäße wurden im letzten Schritt der Anaerobisierung mit 2 bar_{relativ} (entspricht etwa 1 bar Überdruck) Stickstoff belegt. Die so sauerstofffreien Gefäße konnten anschließend unter den normalen Bedingungen der Dampfsterilisation (20 min bei 121 °C und 2 bar_{absolut}) autoklaviert werden. Die leeren Kulturgefäße sollten dabei mit einer geringen Menge an deionisiertem Wasser befüllt sein, damit der entstehende gesättigter Dampf die vorhandenen Mikroorganismen in dem geschlossenen Kulturgefäß abtötet. Zur Sicherheit wurden grundsätzlich druckstabile Gefäße verwendet und aufgrund der eventuell entstehenden Druckdifferenzen in den Gefäßen, diese bis zur vollständigen Abkühlung im Autoklaven belassen und im Anschluss vorsichtig bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.3 Verwendete Methanogene Kulturen

In dieser Arbeit wurden folgende Kulturen über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen: *Methanococcus maripaludis* (DSM 14266), *Methanobacterium formicicum* (DSM 2639) und *Methanobacterium congolense* (DSM 7095). *Methanosarcina barkeri* Stamm Wiesmoor (DSM 800) wurde von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. em. Dr. Scherer bereitgestellt. Für die bioelektrochemische Untersuchung von *Methanobacterium formicicum* wurde nicht der Typstamm DSM 1535 verwendet, da dieser in dem in dieser Arbeit verwendeten Minimalmedien nicht ausreichend gut wuchs. Aufgrund einer Empfehlung von Prof. Dr. Gescher wurde der Stamm DSM 2639 verwendet. Ebenfalls wurde nicht der Typstamm von *Methanococcus maripaludis* DSM 2067 verwendet, sondern der Stamm 14266, da dieser bereits in verschiedenen Publikationen über die Elektromethanogenese zum Einsatz kam und so einen besseren Vergleich gewährleistete [55,69,81].

4.4 Isolierungsmethoden

Die Isolierung erfolgte durch die Methode Dilution-to-Extinction sowie über das Anlegen einer Spannung. Die genaue Beschreibung der Methode erfolgt im anschließenden Unterkapitel. Für die Isolation wurde das HAW-Minimalmedium verwendet [135]. Für eine erste optische Einschätzung, ob Fremdbakterien vorhanden sind, wurde ein Hefeextrakt-Test mit allen Isolaten durchgeführt. Hierfür wurde eine Probe von einem vermeintlichen Isolat in ein

Medium mit 5 g/L Hefeextrakt überführt. Nach einer Inkubation von 2 Tagen bei 37 °C wurde dieses Medium auf Fremdbakterien mittels eines Fluoreszenzmikroskops hin untersucht.

4.4.1 Dilution-to-Extinction

Bei der klassischen Isolierung wurden die Kulturen durch mehrere Male „Überführen in frisches Medium“ verdünnt, Dilution-to-Extinction. Durch das Medium und die verwendeten Antibiotika, siehe Tabelle 19, wurden Fremdorganismen ausgewaschen bzw. getötet. Für die Isolierung wurden folgende Schritte durchgeführt:

1. Verdünnen einer Umweltprobe aus dem Gärslamm einer Biogasanlage im Verhältnis 1:3 mit PBS-Puffer
2. Aufteilung dieser verdünnten Umweltprobe in zuvor anaerobisierte Kulturröhrchen zu je:
 - a) 500 µL verdünnte Umweltprobe
 - b) 4,5 mL Mineralsalzmedium
 - c) Zugabe von Antibiotika, siehe Tabelle 19
 - d) Zugabe von 2 bar_{relativ} Wasserstoff / Kohlenstoffdioxid (80:20) in den Kopfraum oberhalb des Mediums
3. Erste Inkubation für 2 Tage für jede Umweltprobe bei 40 °C
4. Kontrolle des Drucks im Kopfraum mittels Manometer (bei Wachstum erfolgt eine messbare Abnahme des Drucks)
5. Optische Betrachtung der Kultur mittels Fluoreszenzmikroskop
6. Bestgewachsene Kultur mit Methanogenen in frisches Minimalmedium überführen zu je:
 - a) 500 µL verdünnte Umweltprobe
 - b) 4,5 mL Minimalmedium
 - c) Zugabe von 2 bar_{relativ} Wasserstoff / Kohlenstoffdioxid (80/20)
7. Erneute Kultivierung bei entsprechender Temperatur
8. Nach 2 - 3 Tagen Kontrolle der Kultur via Druckmessung und Fluoreszenzmikroskopie
9. Anschließend erfolgte eine Kulturhaltung, in welcher alle zwei Wochen die Kultur in frisches Medium überführt wurde.

4.4.2 Isolation über die Elektromethanogenese

Für eine gezielte Isolierung von elektroaktiven Archaeen gibt es derzeit keine geeignete Methode, außer durch das Verdünnen und der Zugabe von Antibiotika, siehe Kapitel 4.4.1. Verschiedene Studien zeigten allerdings, dass sich die Gattung *Methanobacterium* bevorzugt an den Elektroden ansiedelt [136,137]. In dieser Arbeit sollte eine Methode zur gezielten Isolierung entwickelt werden, da bisher noch keine erfolgreiche Isolierung von Methanogenen unter Anlegen einer Spannung bekannt ist [47].

Zur spannungsbezogenen Isolierung von Methanogenen wurden Elektroden wie bei Call *et al.* 2011 beschrieben hergestellt [138]. Für die Kathode wurde ein Titandraht ($\varnothing = 0,8$ mm, Grade 2) mit einer POCO EDM-3 Graphitfolie von Novotec (2 x 10 x 14 mm) verwendet. Für die Anode wurde ein Edelstahldraht (Werkstoff: 1.4301, $\varnothing = 0,8$ mm) mit einem Edelstahlgeflecht (Werkstoff: 1.4301, Porenweite = 0,25 mm, Kantenlänge = 10 x 14 mm) genutzt. Die beiden Elektroden wurden durch einen blauen Butyl-Stopfen geführt und auf eine 30 mL Wheaton Serum Flasche gebördelt, siehe Abbildung 7 A. Anschließend wurde die Umweltprobe (0,80 mL) in das HAW-Medium (7,2 mL) überführt und eine Spannung von 0,5 V mittels eines Labornetzteiles angelegt. Vorversuche zeigten, dass bei einer solchen Spannung keine hemmenden Mengen an Sauerstoff entstehen, die durch eine Verfärbung des Indikators Resazurin angezeigt werden würden. Bei einer Spannung von 0,8 V verfärbte sich dagegen der Indikator. Die Isolierung erfolgt nach dem Schema in Abbildung 7 B.

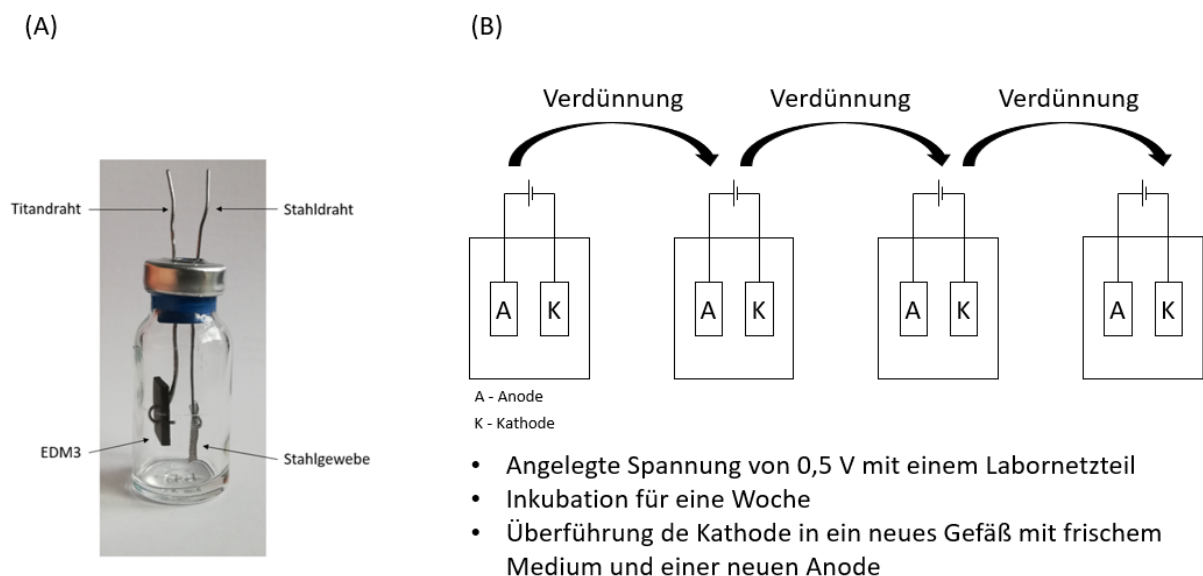


Abbildung 7 Isolierungsstrategie. A, Single-Chamber Reaktor für die Isolierung; B, Schemata für die Isolierung

Die Anreicherung von Methanogenen erfolgte dabei nicht durch das Überführen der Zellsuspension, sondern durch das Überführen der jeweiligen Kathoden in ein neues Gefäß. Dieses Gefäß wurde nach dem Einsetzen der bewachsenen Elektrode dicht verschlossen und anaerobisiert. Dem Reaktionsgefäß wurde frisches Medium hinzugegeben und die Kultur wieder unter Spannung gesetzt. Dabei wurde in den ersten Schritten nur CO₂ dem Medium zugegeben, um somit das Wachstum von Fremdbakterien zu hemmen. Zusätzlich wurden in unterschiedlichen Zusammensetzungen bis zu sechs verschiedene Antibiotika verwendet (Ampicillin, Bacitracin, Kanamycin, Nalidixinsäure, Streptomycin, Vancomycin). Die Inkubation erfolgte bei 40 °C für zwei Wochen.

4.4.3 Entfernen von Fremdbakterien

Zur Beseitigung von Fremdbakterien wurden unterschiedliche Medien verwendet. In dieser Arbeit wurden die mit Fremdbakterien belasteten Kulturen in Medien überführt, welche eine erhöhte Ammoniakkonzentration aufwiesen, siehe Tabelle 16 und Tabelle 17. Methanogene können eine solche kurzzeitige Erhöhung der Ammoniakkonzentration tolerieren und anwachsen [128]. Eine solche Inkubation erfolgte jeweils für eine Woche [56,59,128].

Neben der Anzucht in bakterienhemmenden Medien wurden die Kulturen Temperaturschocks ausgesetzt, indem sie über eine Nacht bei 60 °C inkubiert wurden.

4.5 Molekularbiologische Untersuchungen

Für die molekularbiologischen Untersuchungen der erzeugten Anreicherungskulturen wurden 10 mL der jeweiligen Kultur bei $> 20.000 \times g$ für 10 min bei 10 °C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 1 mL Nuklease-freiem Wasser gewaschen und erneut abzentrifugiert. Für die Extraktion der genomischen DNA wurde das Kit „FastDNA™ SPIN Kit“ (MP Biomedicals, USA) entsprechend der Anleitung verwendet. Zum Entfernen von RNA wurde eine RNase-Behandlung nach der DNA-Extraktion durchgeführt. Dabei wurde 1 µL RNaseA (10 mg/mL) dem Eluat hinzugefügt und bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Für die letzte Reinigung wurde das Kit „Genomic DNA Clean & Concentrator Kit“ (Zymo Research, USA) genutzt. Für die Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die eluierte DNA mittels NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) vermessen und auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetragen. Für eine Identifizierung der Kultur sowie zur Überprüfung des Reinheitsgrades wurde eine PCR der 16S rRNA-Gene mit folgenden Primern durchgeführt: Bakterien 27F und 1492R und Archaeen A337F und A1000R. Neben der Identifizierung der 16S rRNA-Gene wurden die *mcrA*-Gene

für eine genauere Identifizierung genutzt. Die *mcrA*-Gene wurden zusätzlich zu den 16S rRNA-Genen als weiteren Genmarker analysiert, um eindeutigere Ergebnisse in der taxonomischen Zuordnung zu erhalten. In der Tabelle 20 sind die verwendeten Primer und deren Nukleotidsequenz aufgelistet und in der Tabelle 21 ist das Pipettierschema der PCR dargestellt. Tabelle 22 und Tabelle 23 zeigen die jeweiligen PCR-Programme.

Tabelle 20 Auflistung der verwendeten Primer für die molekularbiologischen Untersuchungen

Bezeichnung des Primers	Nukleotidsequenz des Primers	Anwendung für:	Quelle
27F	5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG -3'	Bakterien	[139]
1492R	5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'	Bakterien	[139]
A337F	5'-TAY GGG GYG CAG CAG-3'	Archaeen	[140]
A1000R	5'-GCC ATG CAC YWC YTC TC -3'	Archaeen	[140]
A915R	5'-TGC TCC CCC GCC AAT TCC T-3'	Archaeen	[141]
MLf	5'-GGT GGT GTM GGA TTC ACA CAR TAY GCW ACA GC-3'	Archaeen	[142]
MLr	5'-TTC ATT GCR TAG TTW GGR TAG TT-3'	Archaeen	[142]
ME1f	5'-GCM ATG CAR ATH GGW ATG TC-3'	Archaeen	[142]
ME2r	5'-TCA TKG CRT AGT TDG GRT AGT-3'	Archaeen	[142]
ME3R	5'-TGT GTG AAS CCK ACD CCA CC-3'	Archaeen	[143]

Tabelle 21 Pipettierschema für einen PCR-Ansatz, Positivkontrolle 1 μL einer bekannten gDNA einer Bakterien- oder Archaeen-Kultur, Negativkontrolle 1 μL dd H_2O

Bestandteile	Volumen in μL für 25 μL	Konzentration
PCR-Wasser	17,5	
PCR-Puffer (mit Ladepuffer)	2,5	10fach
dNTP-Mix	3,0	2 mM
MgCl ₂	0,5	25 mM
Reverse-Primer	0,5	50 pmol/ μL
Forward-Primer	0,5	50 pmol/ μL
Taq-DNA-Polymerase	0,125	5 U/ μL
Gesamtvolumen	24,6	

Tabelle 22 Schritte der PCR für die 16S rRNA-Gen-Analyse

Schritte	Temperatur	Dauer	Zyklen
Aufwärmen	95 °C	5 min	1
Denaturierung	95 °C	50 s	30
Annealing	51 °C	50 s	
Elongation	72 °C	50 s	
Extension	72 °C	8 min	1
Kühlen	10 °C		

Tabelle 23 Schritte der PCR für die mcrA-Gen-Analyse [142]

Schritte	Temperatur	Dauer	Zyklen
Aufwärmen	95 °C	2 min	1
Denaturierung	95 °C	30 s	30
Annealing	47 °C	30 s	
Elongation	70 °C	60 s	
Extension	70 °C	10 min	1
Kühlen	10 °C		

Die Archaeen-PCR-Produkte wurden für Sanger-Sequenzierungen mit dem „GenepHlow™ Gel/PCR Kit“ (Geneaid, Taiwan) gereinigt. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma LGC Genomics GmbH (Deutschland) mit dem Primer A915R, siehe Tabelle 20. Wenn die Sequenz einem einzigen Archaeon zugeordnet werden konnte, also keine Sequenzüberlagerungen auftraten, wurde die ermittelte PCR-Sequenz anschließend in das BLAST Tool hochgeladen. Bei einer Sequenzähnlichkeit von über 99,5 % wurde die extrahierte DNA für eine 16S rRNA-Gen Ampliconanalyse via Pair-End-Sequenzierung genutzt, um die gesamte mikrobielle Zusammensetzung der Kultur genauer zu bestimmen.

4.6 Mikroskopische Untersuchung

Für die Bestimmung der planktonischen Gesamtzellzahl und der planktonischen Zellzahl von Methanogenen wurde die QMF-Methode (Quantitative Microscopic Fingerprinting) verwendet [144]. Die Probenvorbereitung wurde für die hier verwendeten Proben leicht abgeändert. Die Probe wurde mit dem Antifading-Reagenz DABCO (5 % w/v in dest. Wasser) im Verhältnis 1:2 vermischt und auf einem mit Methylcellulose beschichteten Objektträger fixiert. Der Objektträger wurde anschließend mit dem Fluoreszenzmikroskop (Leica, Deutschland) mit einer Halogenlampe (Osram, Deutschland) untersucht und die Zellzahl bestimmt.

Für jede Probe wurden mindesten 20 Bilder bei einer 400-fachen Vergrößerung erstellt. Die Detektion der Methanogene erfolgte mit dem Filterwürfel CFP (Leica, Deutschland) bei einer Anregung mit einer Wellenlänge von 426–446 nm und einer entsprechenden Emission bei 460–500 nm. Für die Bestimmung der Gesamtzellanzahl wurde der Filterwürfel L5 (Leica, Deutschland) mit einer Anregung mit einer Wellenlänge von 460-500 nm und einer Emission von 512–542 nm genutzt. Hierfür wurden die Zellen mit SYBR Green I eingefärbt [145]. Die einzelnen Bilder wurden mit der Kamera DFC365FX von Leica erfasst, mit dem Programm Image Pro 7 Plus Version 7.0.1.658 (Media-Cybernetics, USA) analysiert und mit Hilfe der QMF-Makros quantifiziert.

4.7 Konstruktion der H-Zellen

Für die Erforschung von elektroaktiven Mikroorganismen werden hauptsächlich H-Zellen verwendet. Jedoch gibt es derzeit keinen standardisierten Aufbau von H-Zellen, sodass jede Forschungsgruppe ihren eigenen Reaktor konstruiert. In den folgenden Kapiteln werden die zwei verschiedenen Reaktorsysteme dieser Arbeit genau beschrieben. Für die Untersuchung der Elektromethanogenese wurde das angepasste 141 Medium der DSMZ verwendet.

4.7.1 Kleines Reaktorsystem

Für die Untersuchung der Elektromethanogenese wurde eine H-Zelle mit einem Arbeitsvolumen von 100 mL genutzt. In Abbildung 8 ist der komplette Aufbau des kleinen Reaktorsystems dargestellt. Hierfür wurden pro H-Zelle jeweils zwei 100 mL Laborgewindflaschen von einem Glasbläser mit einem Flansch der Größe DN25 versehen. Zusätzlich wurden je Flasche zwei weitere, kleine Flansche (DN18) gegenüber dem Größeren Flansch angebracht (Abbildung 8A, Nr. 1).

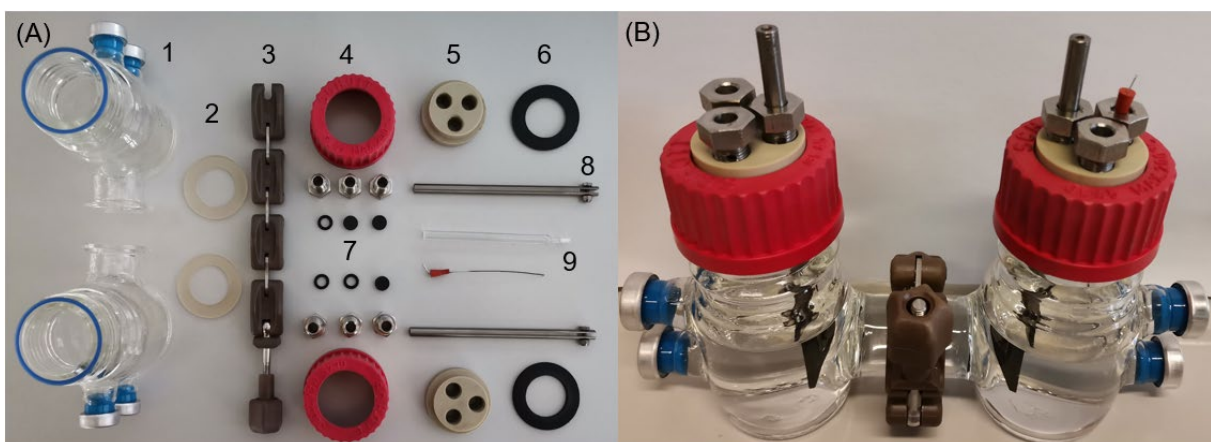


Abbildung 8 Aufbau der kleinen H-Zelle. (A) Einzelteile der kleinen H-Zelle mit allen Teilen und (B) aufgebauter Reaktor. 1: 100 mL Glaskörper mit einem DN25 Flansch mit Chlorobutyl-Stopfen und Aluminiumkappen; 2: Silicon Flachdichtung, DN25; 3: Kettenschelle DN25; 4: Deckel mit Loch; 5: Deckel aus PEEK mit 3 M10x1 Bohrungen; 6: Dichtungsringe aus Brombutyl, GL 14; 7: Hohlschrauben (Edelstahl Werkstoff: 1.4301) mit Dichtungsringen und passenden Septen aus Butylkautschuk mit einem \varnothing 6 mm; 8: Elektrodenhalter aus Titan (Reinheit 2) und passende Verschraubungen; 9: Glaskörper für Referenzelektrode mit einer Magnesiumfritte, Silberdraht mit Silberchlorid beschichtet und Silicon Stopfen

Die beiden Deckel des Reaktors bestehen aus Polyetheretherketon (PEEK von KTK Kunststofftechnik), welche je mit drei Bohrungen (\varnothing 6 mm) versehen wurden (Abbildung 8A, Nr. 5). In diesen Bohrungen wurden die Elektroden und Septen (Butylkautschuk von Reichelt Chemietechnik) befestigt. Eine technische Zeichnung ist im Anhang Seite XI hinterlegt.

Der Elektrodenhalter bestand aus Titan (\varnothing 6 mm, Reinheit: Grade 2 von ARA-T) mit einer 2 mm Bohrung am oberen Ende für eine sichere Steckverbindung mit dem Potentiostat über einen Lamellenstecker. Am unteren Ende der Halterung war eine 2 mm Kerbe sowie eine Bohrung für eine Titanschraubenschraube (Grade 2, der Schraubenladen). Dies sorgte für eine feste Verbindung mit der eigentlichen Elektrode und dem Elektrodenhalter (Abbildung 8A, Nr. 8). Die Elektrode bestand aus Graphit (POCO, EDM-3, Novotec) mit einer Oberfläche von

10,4 cm². Die Gesamtoberfläche der Elektrode einschließlich des eingetauchten Titan-Stabes betrug 13,6 cm². Die Gegenelektrode hatte den gleichen Aufbau.

Eine feste und gasdichte Verbindung der Elektrode und dem Deckel wurde mittels einer Edelstahlhohlschraube (Werkstoff: 1.4571, Schwer Fittings GmbH) und einem Dichtring (Butyl-Kautschuk, Reichelt Chemietechnik) sichergestellt (Abbildung 8A, Nr. 7). Der komplette Deckel wurde mit einem Schraubverschluss (Abbildung 8A, Nr. 4) sowie einem weiteren Dichtungsring (Abbildung 8A, Nr. 6) verschlossen. Die beiden Kompartimente wurden durch zwei Silikondichtungen (Abbildung 8A, Nr. 2), der NafionTM Membran (Quintec) und einer Klemmkette (Abbildung 8A, Nr. 3, EVAC AG) verbunden. Die zusammengesetzte H-Zelle (Abbildung 8B) wurde anschließend autoklaviert. Nach der Sterilisation wurde der Glaskörper der Referenzelektrode mit KCl (3 M) gespült und gefüllt. Der beschichtete Silberdraht mit Silberchlorid wurde zum Schluss in den Glaskörper (Abbildung 8A, Nr. 9) eingefügt.

4.7.2 Großes Reaktorsystem

Neben den kleinen H-Zell-System wurde ein größeres Reaktorsystem mit einem Reaktionsvolumen von 350 mL entwickelt. Mit dem größeren Reaktorsystem konnten verschiedene physikalische Standardgrößen wie Druck, pH-Wert und Temperatur kontinuierlich gemessen und aufgezeichnet werden. Des Weiteren wurde für dieses System eine halbautomatisierte Steuerung entwickelt.

Der Glaskörper der großen H-Zelle wurde nach einem Modell von Prof. Dr. Zeng (ehemaliger Doktorvater, Professur an der TUHH bis 2021) von einem Glasbläser manuell angefertigt und um einen Doppelmantel zur Temperierung erweitert. Für die Sensoren und Verbindungsstecker zur Messung der Temperatur, des pH-Wertes, des Druckes, für die Halterungen der Elektroden sowie zur Be- und Entgasung wurde in dieser Arbeit eigens ein Deckel entworfen, indem alle benötigten Ports mit ausreichend Abstand zueinander positioniert sind. Dieser Deckel bestand identisch zur kleinen H-Zelle aus PEEK. In Abbildung 9 ist der komplette Aufbau der großen H-Zelle abgebildet und im Anhang ist eine technische Zeichnung des Reaktordeckels hinterlegt, siehe Seite XII.

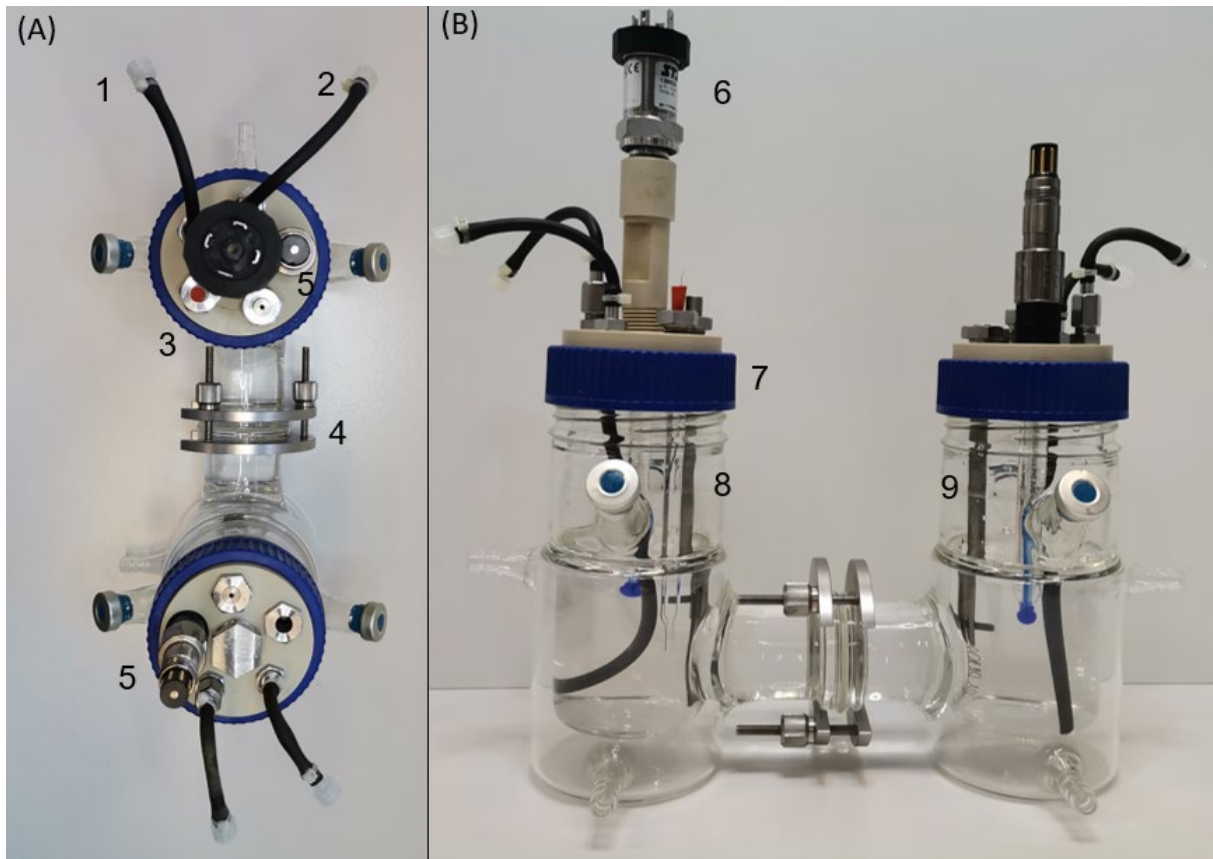


Abbildung 9 Aufbau der großen H-Zelle. (A) oben, (B) frontal. 1: Durchführung für die Begasung, Schlauch = Neopren; 2: Durchführung für die Entgasung, Schlauch = Neopren; 3: Referenzelektrode mit Ag/AgCl-Draht und Silikonstopfen; 4: Dreipunktklemme mit Silikondichtung und Nafion™ Membran; 5: pH-Elektrode Hamilton (EASYFERM PLUS PHI ARC 120); 6: Drucktransmitter (STS ATM); 7: PEEK Deckel mit den verschiedenen Verschraubungen und einem Dichtungsring; 8: Elektrodenhalter aus Titan (Reinheit 2) mit Graphitplatte (POCO, EDM-3) und passende Verschraubungen; 9: Elektrodenhalter aus Titan (Reinheit 2) mit Platindraht (99,9 %)

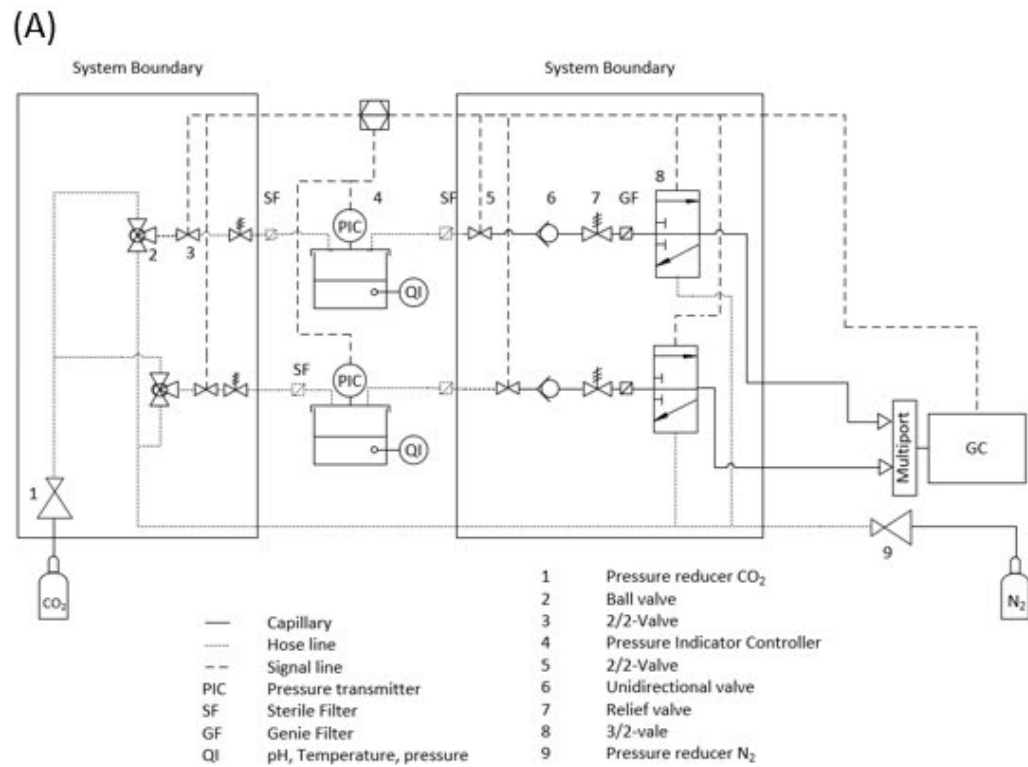
Der Deckel hatte insgesamt sechs Ports für die folgenden Anschlüsse: Be- und Entgasung, kombinierte pH- und Temperaturmessung, Druckmessung und Anschlüsse für die Messelektroden. Für die Messelektroden wurde ein Titanrundstab (\varnothing 8 mm, Reinheit: Grade 2 von ARA-T) sowie Glashohlkörper mit je 8 mm Durchmesser verwendet. Diese Stäbe wurden jeweils mit einer Hohlschraube M12x1,5 und einem Dichtring fest im Deckel verschraubt. Der Titanstab besaß am oberen Ende eine 2 mm Bohrung für den Lammellenstecker des Potentiostaten. Am unteren Ende wurde eine 2 mm dicke Kerbe für die Befestigung der Graphitelektrode hinzugefügt. Diese wurde fest mit einer Titanschraube mit dem Titanstab verbunden. Das Graphit (POCO, EDM-3 von Novotec) der Elektrode hat eine Fläche von 35,3 cm². Die Gesamtoberfläche der Elektrode einschließlich des eingetauchten Stabes betrug 45,7 cm². Die Gegenelektrode in der großen H-Zelle bestand aus einem Platindraht (Reinheit 99,95 %) mit einer Länge von 25 cm und einem Durchmesser von 0,5 mm.

Für die Be- und Entgasung wurde ein Loch mit einem Durchmesser von 11 mm in den Deckel gebohrt und mit den entsprechenden Durchführungen versehen. Für die pH/Temperatur Messelektroden (Hamilton EASYFERM PLUS PHI ARC 120) wurde eine Verschraubung nach Herstellerangaben, PG13,5, dem Deckel hinzugefügt sowie eine G ½" Bohrung für den Drucktransmitter. Auf diese Verschraubung wurde aufgrund des Platzbedarfes des Drucktransmitters (STS ATM) eine 7 cm lange Verlängerung angebracht. Diese Verlängerung wurde jeweils mit einem Dichtungsring an beiden Seiten abgedichtet. Die beiden Kompartimente des Reaktors wurden mittels zwei Silikondichtungen, der Nafion-Membran und einer Dreipunktklemme miteinander verbunden.

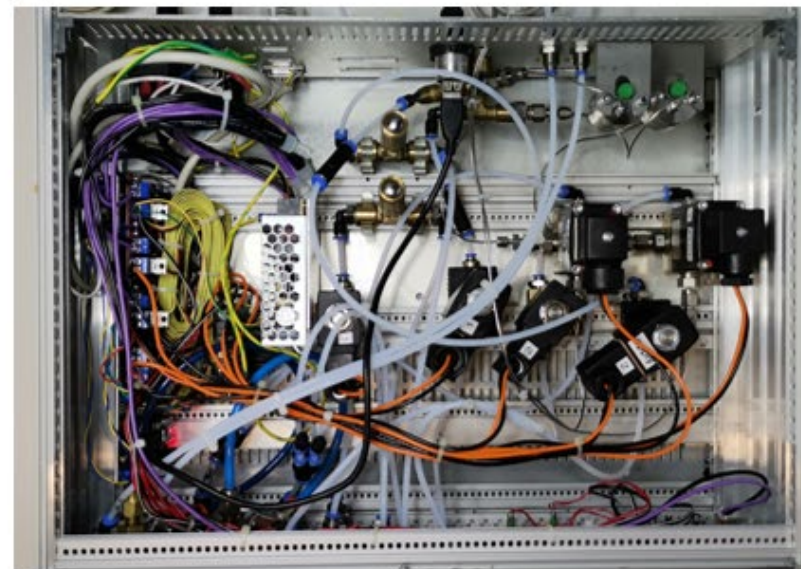
Der große Reaktor wurde im Stand-Alone-Modus betrieben. Für diesen Aufbau wurde ein Anwendungsdesign entwickelt, in dem alle technischen Zustände des Reaktors definiert wurden. Basierend auf diesem Design wurde ein Mikrocontroller (Arduino nano) ausgewählt, der alle Ventile steuert, die Daten des Drucktransmitters sammelt und mit dem Gaschromatographen interagiert. Die pH-/Temperaturelektroden wurden über einen USB-RS485 Modbus-Converter von Hamilton direkt mit dem PC verbunden.

Für die Verwaltung des Mikrocontrollers und der pH-/Temperaturelektroden wurde ein Softwareprogramm in Python (Version 3.9.1) entwickelt. Außerdem wurden eine Probenahme-Routine für periodische und zusätzliche Probenahmen sowie ein Verfahren zur Anaerobisierung programmiert. Die Steuerung ermöglichte es ebenfalls, alle Ventile im Bedarfsfall einzeln zu schalten. Die Software zeichnete alle 60 Sekunden den pH-Wert, die Temperatur und den Druck auf.

Die Steuerung ist in fünf Prozessabschnitte unterteilt: 1) Spülen mit Stickstoff, 2) Spülen mit Fütterungsgas, 3) Probenahme, 4) Zugabe des Fütterungsgases und 5) der eigentliche Betrieb. In einem Rohrleitungs- und Instrumentenfließschema ist der prinzipielle Aufbau der großen H-Zelle aufgezeichnet, siehe Abbildung 10. In Abbildung 11 sind die jeweiligen Zustände während des Betriebes anhand von farblicher Markierung dargestellt.



(B)



(C)



Abbildung 10 Rohrleitungs- und Instrumentenfließschema der großen H-Zelle. (A) Rohrleitungs- und Instrumentenflussdiagramm, (B) tatsächlicher Aufbau des Kontrollsystems, (C) Vorderseite des Kontrollsystems mit verschiedenen Anschlüssen für die Zufuhr und Abnahme von Gas

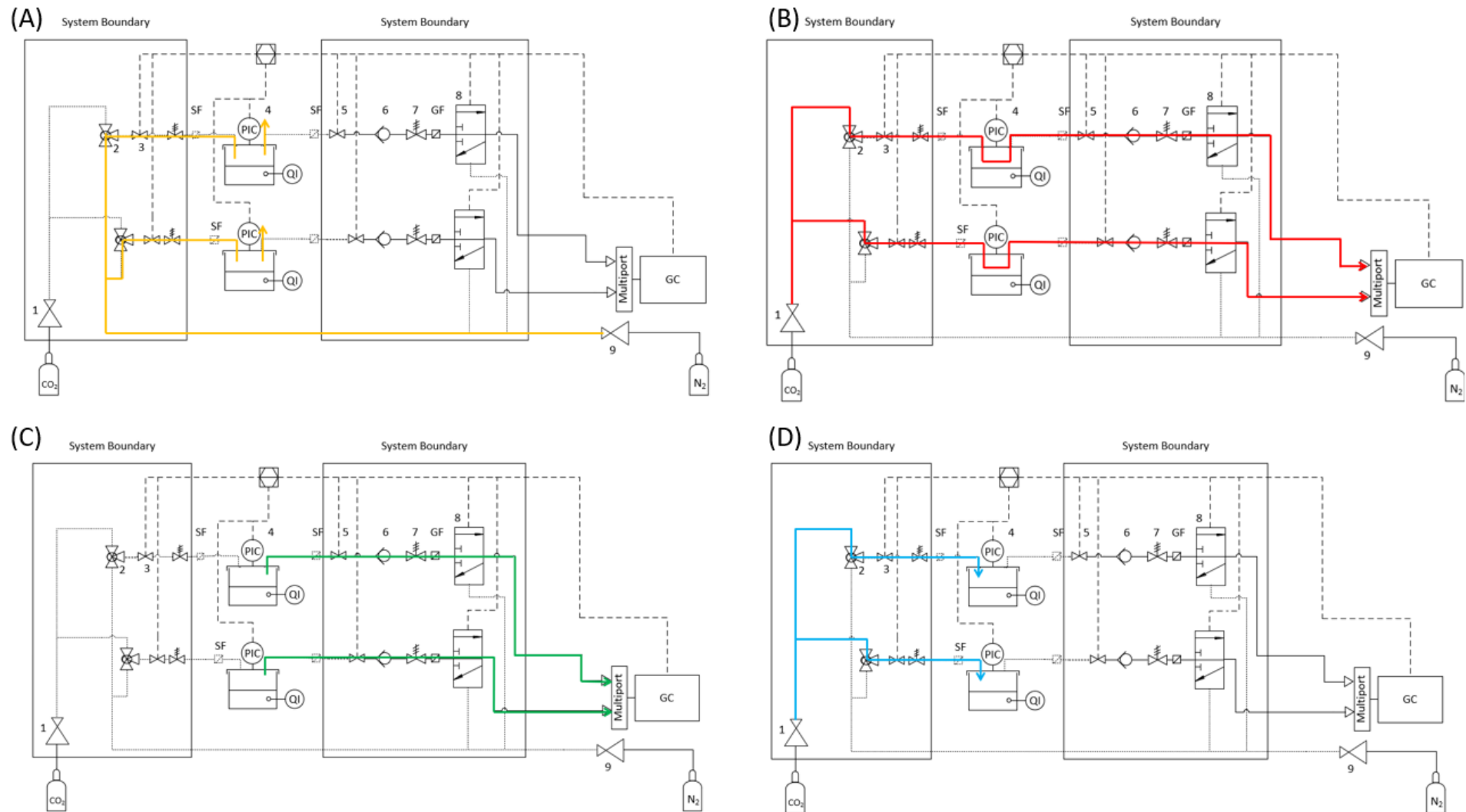


Abbildung 11 Zustände in der großen H-Zelle. (A) Spülen mit Stickstoff, (B) Spülen mit Kohlenstoffdioxid, (C) Probenahme, (D) Zugabe von Kohlenstoffdioxid

Zum Start des Betriebes bzw. der Untersuchung der Elektromethanogenese wurde der große Reaktor nach dem Autoklavieren anaerobisiert, siehe Abbildung 11 (A). Hierfür wurde das entsprechende Ventil 2 auf Stickstoff gestellt und der Reaktor für 45 min mit Stickstoff gespült. Anschließend wurde für 10 min mit N₂:CO₂ Gemisch (80:20) oder CO₂ durch Schalten des Kugelhahnventils auf CO₂ begast, siehe Abbildung 11 (B). Während des Betriebes bzw. des Versuchs waren alle Ventile geschlossen. In dieser Zeit wurden kontinuierlich der pH-Wert, die Temperatur und der Druck aufgezeichnet. Zu gegebener Zeit wurden automatisch die Ventile zum Gaschromatographen (GC) hin geöffnet und über eine Pumpe am GC eine Gasprobe aus dem Kopfraum der jeweiligen Kathode genommen (Abbildung 11 (C)). Der GC zog für 45 s (mit einer mittleren Förderleistung von 28 mL/min, entspricht 21 mL/45 s) die Gasprobe von dem jeweiligen Reaktor. Der Totraum der Schläuche betrug ca. 15 mL. Nachdem die Probe genommen wurde, wurden alle Ventile zum GC hin geschlossen. Daraufhin wurde über ein Ventil das jeweilige Fütterungsgas in den Reaktor bis zu dem voreingestellten Druck eingelassen, siehe Abbildung 11 (D). Für eine bessere Übersicht und Steuerung der Versuche wurde eine grafische Oberfläche erstellt, siehe Abbildung 41 - Abbildung 45 im Anhang auf den Seiten XIII - XV.

4.7.3 Anaerobisierung der Reaktoren

Für die Anaerobisierung der kleinen H-Zellen wurde das Medium mit Stickstoff für mind. 15 min begast, bei der großen H-Zelle für 45 min. Dadurch wurde der Sauerstoff im Medium durch den Stickstoff verdrängt [70,146,147]. Anschließend wurden die Reaktoren mit einem Druck von 0,5 bar_{relativ} mit einem N₂:CO₂ Gemisch (80:20) belegt. Der große Reaktor wurden mit einem Druck von circa 0,5 bar_{relativ} mit einem N₂:CO₂ Gemisch (80:20) oder technischen CO₂ betrieben.

4.7.4 Protonierung der Membran

Für eine optimale elektrisch leitende Membran wurde diese vor jedem Versuch protoniert [73]. Die Behandlung erfolgte in drei Schritten: Im ersten Schritt wurde die Membran für 1 h in 3 %igen H₂O₂ bei 80 °C gewaschen. Im zweiten Schritt wurde die Membran für 2 h bei 80 °C mit dest. H₂O gespült. Im letzten Schritt wurde die Membran für 1 h in 0.5 M H₂SO₄ gewaschen. Anschließend wurde die behandelte Membran bis zum Versuch in dest. Wasser gelagert [108,148–150].

4.7.5 Herstellung einer Silber-Silberchlorid-Elektrode

Für die Herstellung einer Ag/AgCl-Referenzelektrode wurde ein Silberdraht (Reinheit: 99,9 %), eine gesättigte KCl-Lösung (3 M), eine Kohlenstoffelektrode (EDM-3, NovoTec) und eine käuflich zu erwerbende Ag/AgCl-Elektrode als Standardelektrode (RE-1B, C3) benötigt. Die Kohlenstoffelektrode diente als Gegenelektrode, die Standardelektrode wurde als Referenzelektrode verwendet und der Silberdraht diente als Arbeitselektrode. Diese drei Elektroden wurden in die gesättigte KCl-Lösung überführt und die Silberelektrode wurde mittels eines Potentiostaten elektrochemisch oxidiert, siehe Anhang Seite XVI. Die hergestellte Ag/AgCl-Elektrode wurde in einem 15 mL Tube bis zum nächsten Experiment trocken gelagert. Die Methodik für die Herstellung der Ag/AgCl-Elektrode wurde von Carola Berger, Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie - Hans-Knöll-Institut, freundlicherweise bereitgestellt.

4.8 Rasterelektronenmikroskopie

Die Bildung von Biofilmen an den Kathoden wurde mit dem Rasterelektronenmikroskop untersucht. Für die Rasterelektronenmikroskopie wurden die Elektroden für 24 h in einer 3 %igen Glutaraldehyd-Lösung fixiert. Anschließend wurden die Elektroden jeweils für 15 min in PBS gewaschen. Darauffolgend wurden die Elektroden mit einer Ethanolreihe 50, 70, 90 % (v/v) je 20 min und 3 mal 100 % (v/v) für je 20 min behandelt und im Exsikkator bis zur Rasterelektronenmikroskopie aufbewahrt [151]. Für eine höhere Auflösung konnten die Elektroden mit Gold besputtert werden. Die Aufnahmen wurden mit dem FEG-REM LEO 1530 (Zeiss, Deutschland) mit einem Everhart-Thornley Detektor und einer Spannung von 2 bis 10 kV aufgenommen (Standort: TUHH, Hamburg).

4.9 Elektrochemische Experimente

4.9.1 Chronoamperometrie

Die elektrochemischen Experimente wurden mit einem Potentiostaten von Biologic (Claix, Frankreich) in einem 3-Elektroden-System durchgeführt. Die Daten für die Stromdichte wurden alle 60 s aufgenommen.

4.9.2 Bilanzierung der elektrochemischen Experimente/Coulombsche Effizienz

Für die Bilanzierung der elektrochemischen Experimente wurde die Coulombsche Effizienz (CE) berechnet. Die CE wurde folgendermaßen ermittelt:

$$CE = \frac{n_{\text{gemessen}}}{n_{\text{therotisch}}}; n_{\text{therotrisch}} = \frac{\int_0^t I dt}{z \times F} \quad (7)$$

n	Stoffmenge des Gases
$\int_0^t I dt$	Stromdichte über die Zeit gemessen in A s
z	Anzahl der Elektronen, 8 Elektronen für Methan, 2 Elektronen für Wasserstoff
F	Faraday'sche Konstante mit 9.6485,332 A s/mol.
n	Stoffmenge des Gases in mol

Für die Bestimmung der CE in der großen H-Zelle wurde die Berechnung angepasst. In der großen H-Zelle wurde nur ein Teil des Kopfraumvolumens entnommen. Danach wurde Fütterungsgas entsprechend dem voreingestellten Druck wieder hinzugefügt. Zur Berechnung der CE wurde die Stoffmenge der letzten Messung (n_{t0}) von der Stoffmenge der aktuellen Messung (n_{t1}) subtrahiert. Dementsprechend wurde für die Berechnung der CE in der großen H-Zelle die folgende Gleichung verwendet:

$$\Delta CE = \frac{(n_{t1, \text{gemessen}} - n_{t0, \text{gemessen}})}{n_{\text{theoretisch}}} \quad (8)$$

$n_{t1, \text{gemessen}}$	Stoffmenge der aktuellen Messung in mol
$n_{t0, \text{gemessen}}$	Stoffmenge der letzten Messung in mol

Für die Bestimmung der gemessenen Stoffmenge n_{gemessen} mussten zunächst die Messwerte des Gaschromatographen von ppm in die jeweilige Stoffmenge in Mol umgerechnet werden. Anschließend wurde die Stoffmenge n in das Verhältnis zu 1.000.000 Teilchen gesetzt, da die Konzentration ppm (parts per million) ein Teil pro eine Million an Teilen entspricht.

$$p \times V = n \times R \times T \rightarrow n = \frac{p \times V}{R \times T} \quad (9)$$

$$n_{gemessen} = \frac{n_{Gasgleichung} \times \text{Teilchen}_{gemessen}}{1.000.000 \text{ Teilchen}} \quad (10)$$

p	Druck in kPa
V	Volumen des Kopfraumes
R	allgemeine Gaskonstante mit $8,314 \frac{kPa L}{mol K}$
T	Temperatur in Kelvin

Das Volumen des Kopfraumes in den kleinen H-Zellen betrug 50 mL. In der großen H-Zelle betrug der Kopfraum im Reaktor 1 290 mL und im Reaktor 2 370 mL. Die unterschiedlichen Volumina des Kopfraumes in der großen H-Zelle kamen durch den unterschiedlichen Aufbau der Glaskörper zustande. Es konnten aufgrund von Lieferengpässen während der Corona-Pandemie keine gleichen Glaskörper bezogen werden.

4.9.3 Ablauf der bioelektrochemischen Versuche in der kleinen H-Zelle

Die Untersuchungen in der kleinen H-Zelle wurden jeweils in einem 3-fachen Ansatz durchgeführt. Dabei wurde das Minimalmedium M141 verwendet, siehe Tabelle 15. Parallel wurden jeweils zwei Referenzen mitgeführt. Bei den Versuchen in den kleinen H-Zellen wurde jeweils alle 7 Tage ein Probenvolumen von 1 mL entnommen und damit Zellzahl, optische Dichte, pH und Leitfähigkeit bestimmt. Der Druck und die Gaszusammensetzung der Reaktoren wurden dagegen täglich gemessen. Alle kleinen H-Zellen wurden zur Schaffung einheitlicher Versuchsbedingungen bei 41 °C betrieben, da bei dieser Temperatur das Optimum der Kultur EE liegt und alle weiteren Kulturen ihr Temperaturoptimum mit 38-40 °C in unmittelbarer Nähe hatten.

4.9.4 Ablauf der bioelektrochemischen Versuche in der großen H-Zelle

Die Versuche in der großen H-Zelle wurden jeweils in zwei Parallelen durchgeführt mit einer kontinuierlichen pH-, Temperatur- und Druck-Messung. Für die Zellzahlbestimmung wurde jeweils 1 mL Probe aus dem Reaktor entnommen. Für die Experimente in der großen H-Zelle wurde der Mikroorganismus *Mc. maripaludis* verwendet, da dieser die besten Ergebnisse in den kleinen Reaktoren zeigte. Aus diesem Grund wurden die Versuche in der großen H-Zelle bei einer Temperatur von 38 °C mit dem Minimalmedium M141 (siehe Tabelle 15) durchgeführt.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Isolation von Methanogenen aus Biogasgärschlamm

Für die Ermittlung von gut geeigneten Methanogenen für die Elektromethanogenese wurden neben den verschiedenen kommerziell bezogenen Reinkulturen (DSMZ) zusätzlich methanogene Archaeen aus mesophilen Biogasanlagen isoliert. Ziel der Isolierung war es, eine methanogene Kultur zu finden, welche eine höhere Methanproduktivität aufweist als bereits genutzte Methanogene. Eine solche Isolation kann die Grundlage für die Beantwortung der ersten grundlegenden Fragestellung dieser Arbeit sein.

Hierfür wurden zwei verschiedene Methoden genutzt. Bei der Dilution-to-Extinction Methode wurden verschiedene Gärschlamm-Proben über mehrere Schritte hin verdünnt. Die Isolation durch das Anlegen einer Spannung hatte zum Ziel, elektroaktive Methanogene an einer Elektrode anzureichern. Die Anreicherung erfolgte in einem Minimalsalzmedium (HAW-Medium) unter Zusatz von ausgewählten Antibiotika (siehe Kapitel 4.1) [126,152].

5.1.1 Dilution-to-Extinction

Mit der Methodik Dilution-to-Extinction konnten insgesamt 25 verschiedene Anreicherungskulturen angezogen werden. Diese Kulturen hatten jeweils unterschiedliche Grade an Kontaminationen mit Fremdbakterien.

Der größte Teil der Anreicherungskulturen starb nach der antibakteriellen Inkubation in den verschiedenen Medien ab. Die Kultur 11 zeigte als einzige Anreicherungskulturen ein gutes Wachstum, nach einer Inkubation von zwei Wochen im Harnstoffmedium, nachdem sie wieder in das HAW-Medium überführt wurde. Bei dieser Kultur konnten mittels Hefeextrakt-Tests kein Wachstum von Fremdbakterien mehr festgestellt werden.

Die methanogenen Archaeen der Kultur 11 (K11) weisen die Form von gekrümmten Stäbchen auf. K11 stammt aus einer Biogasanlage, welche als Substrat ausschließlich Zuckerrüben nutzt. Das Temperaturoptimum von K11 liegt bei 39 °C und das pH-Optimum bei pH 7.5. Eine detaillierte Übersicht der Isolation sowie die Temperatur- und pH-Kurven von K11 sind im Anhang (Seite XVII) zu finden.

5.1.2 Isolierung von Methanogenen durch das Anlegen einer Spannung

Neben der klassischen Isolierung von Methanogenen ist eine Isolierung bzw. Anreicherung über die Elektromethanogenese bzw. über das Anlegen einer Spannung interessant, da sich hier speziell die elektroaktiven Methanogene anreichern könnten. Bei vorherigen Studien zeigte sich, dass sich die Gattung *Methanobacterium sp.* bevorzugt an Elektroden ansiedelt [136,137,153].

Die Isolierung von Methanogenen erfolgte dabei nicht durch das Überführen der Zellsuspension, sondern durch das Überführen der jeweiligen Elektroden in ein neues Gefäß. Bereits nach dem siebten Umsetzen der Elektrode in neues Medium wurde ein negativer Kontaminationstest via Hefeextrakt-Lösung erreicht. Durch diese Methode wurden insgesamt drei Anreicherungskulturen aus Gärslämmen von Biogasanlagen isoliert: Kultur EE (Substrat der Biogasanlage: Gülle, Mais), Kultur EHL (Substrat der Biogasanlage: Rindergülle) und Kultur EH (Substrat der Biogasanlage: Pferdemist). Für die weitere Kultivierung wurden diese Kulturen in anaerobe Kulturröhrchen mit HAW-Medium überführt. Eine detaillierte Übersicht der Isolation der Kulturen EE, EHL, EH befindet sich im Anhang (Seite XIX). Die Kultur EE wies ebenso wie K11 die Morphologie von gekrümmten Stäbchen auf und zeigte im Vergleich zu den Kulturen EH und EHL eine hohe Wachstumsstabilität. Aus diesem Grund wurde die Kultur EE für weitere Versuche in dieser Arbeit verwendet. Das Temperaturoptimum der Kultur EE liegt bei 41 °C. Das pH-Spektrum, bei dem ein Wachstum stattfindet, reicht von pH 6,5 bis 7,5.

5.1.3 Molekularbiologische Charakterisierung

Für die Identifizierung von unbekanntem Organismen wird meist die Sequenzierung eines Teilstückes des 16S rRNA-Gens verwendet [154]. Die Sequenzierungsergebnisse zeigten, dass die beiden isolierten Kulturen zu 99,7% (K11) bzw. 99,5% (EE) ähnlich zu *Methanobacterium formicicum* sind. Anschließend wurden von den Kulturen K11 und EE jeweils eine 16S rRNA-Gen Ampliconanalyse via Paired-End Sequenzierung durchgeführt. Es bestätigte sich, dass es sich bei den Kulturen K11 (Bioproject ID PRJEB52005 at ENA) und EE (Bioproject ID PRJEB65119 at ENA) jeweils um Reinkulturen handelt.

5.1.4 Biochemische Charakterisierung

Die molekularbiologischen Untersuchungen der 16S rRNA-Gene zeigten, dass die untersuchten Kulturen K11 und EE jeweils der Spezies *Mb. formicicum* angehören. Aufgrund dieser Tatsache wurden weitere molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt, um eine genauere taxonomische Identifikation erreichen zu können. Dabei wurden die *mcrA*-Gene der Kulturen K11 und EE analysiert.

Die ermittelte DNA-Sequenz der *mcrA*-Gene ergab bei beiden isolierten Stämmen nur eine Sequenzübereinstimmung von 94 % zu *Mb. formicicum*. Im Vergleich dazu lag die Sequenzübereinstimmung der 16S rRNA-Gene für die Kultur K11 mit 99,7 % und für Kultur EE mit 99,5 % deutlich höher. Allerdings sind die Sequenzabschnitte des *mcrA*-Gens mit den derzeitigen PCR-Bedingungen jeweils nur 150 bp lang, was eine detailliertere Betrachtung des Elektropherogramms der Sequenzierung erforderte. In Abbildung 12 ist ein Ausschnitt des Elektropherogramms zwischen dem 340. und 360. Basenpaar zu sehen. In diesem Bereich sind viele Überlappungen der Peaks zu erkennen. Diese kommen zustande, wenn an der gleichen Position unterschiedliche Basen in gleicher Konzentration vorhanden sind. Diese Überlappungen und das Vorkommen von Abschnitten mit nur einer eindeutigen Basenfolge deuten darauf hin, dass wahrscheinlich mehr als ein *mcrA*-Gen innerhalb dieses Stammes von *Mb. formicicum* vorhanden ist. Es ist bekannt, dass parallel mehrere *mcrA*-Gene nebeneinander auftreten können [155–158]. Eine zusätzliche taxonomische Abgrenzung zu anderen Stämmen von *Mb. formicicum* war aufgrund der überlagerten *mcrA*-Gene nur eingeschränkt möglich.

Die isolierten Stämme K11 und EE zeigten in den verwendeten Medien (HAW- und M141-Medium) jeweils ein gutes Wachstum im Gegensatz zu den Referenzstämmen (DSM 2639 und DSM 2607), die kaum oder gar nicht wuchsen.

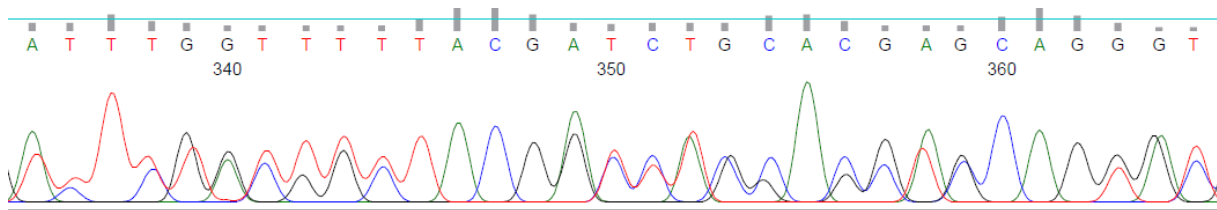


Abbildung 12 Ausschnitt des Elektropherogramms der *mcrA*-Gene der Kultur K11 (Primer: MLf und MLr)

5.1.5 Fazit der Isolierung

Die zwei erfolgreich isolierten Methanogene sind jeweils in ihrer Sequenzübereinstimmung der 16S rRNA-Gene zu 99,7 % (K11) bzw. 99,5 % (Kultur EE) ähnlich zu *Methanobacterium formicicum*. Der Genus *Methanobacterium* wurde bereits in verschiedenen Biogasanlagen

gefunden sowie unter Laborbedingungen auf Kathoden von elektrochemischen Zellen nachgewiesen [137,159]. Des Weiteren kommt die Spezies *Mb. formicum* vor allem in Biogasanlagen vor, welche mit Pferdemist und/oder mit Zuckerrüben betrieben werden [56,65]. Die Kultur K11 wurde aus dem Gär Schlamm einer Biogasanlage isoliert, welche zum Zeitpunkt der Probenahme, ausschließlich Zuckerrüben als Substrat hatte. Die Kultur EE stammt aus einer Biogasanlage, welche zum Zeitpunkt der Probenahme mit Pferdemist und Mais betrieben wurde. Die oben beschriebenen Isolierungsmethoden scheinen die Isolierung der Spezies *Mb. formicum* zu begünstigen, da diese sich bei allen Isolierungsversuchen durchgesetzt hat. Die isolierten Reinkulturen wurden anschließend in den Versuchen zur Überprüfung der Eignung für die Elektromethanogenese eingesetzt.

*Die in dieser Arbeit isolierten Stämme werden der Spezies
Methanobacterium formicum zugeordnet und erhalten die
Stammbezeichnungen K11 und EE: Mb. formicum Stamm K11 (Bioproject
ID PRJEB52005 at ENA) und Mb. formicum Stamm EE (Bioproject ID
PRJEB65119 at ENA).*

5.2 Elektrochemische Versuche in den kleinen H-Zellen

Für die Untersuchung der elektroaktiven Eigenschaften der Methanogene bzw. der Unterscheidung zwischen direkter und indirekter Methanogenese wurden zunächst die kleinen H-Zellen aufgrund ihrer einfachen Handhabung für die ersten Experimente verwendet.

Es folgt eine grobe Zusammenfassung der Versuchsabläufe in den kleinen H-Zellen. Detaillierte Informationen hierzu sind in Kapitel 4.7 zu finden. Die elektrochemischen Versuche hatten jeweils eine Versuchslänge von 17 Tagen. Nach dem Sterilisieren und dem Befüllen mit zellfreiem Minimalmedium M141, siehe Tabelle 15, an Tag 0 und der Reduktion des Mediums über drei Tage hinweg bei -700 mV, wurden an Tag 3 die Reaktoren jeweils mit einer Zellzahl von $1,0 \times 10^7$ Zellen pro mL der entsprechenden Kultur beimpft. Insgesamt wurden pro Versuch fünf H-Zellen verwendet. Dabei dienten zwei Reaktoren als zellfreie/abiotische Referenzen. In der ersten Woche nach Beimpfung (Tag 3 – 10) wurde ein Potential von -300 mV angelegt und in der direkt anschließenden Woche (Tag 10 – 17) ein Potential von -700 mV. Innerhalb der beiden Versuchsabschnitte von jeweils einer Woche wurde insgesamt vier Mal alle 24 h eine Gasprobe analysiert sowie der Druck gemessen. Nach der vierten 24 h-Probe an Tag 7 bzw. an Tag 14 wurden jeweils weitere Proben erst nach 72 h genommen (Tag 10 und Tag 17). Anschließend wurde die Kultivierung bei Bedarf bei einem Potential von -700 mV fortgeführt. Alle angegebenen Potentiale beziehen sich auf eine Standardwasserstoffelektrode.

5.2.1 Physikochemische Daten

Für optimale Effizienzen und Ausbeuten einer elektrochemischen Reaktion müssen viele Parameter betrachtet werden, u.a. der pH-Wert, die Temperatur und die Leitfähigkeit [94]. Weitere Parameter, wie die optische Dichte, der Druck und die Zellzahl, werden für die Beurteilung der jeweiligen verwendeten Kultur genutzt.

In den oben beschriebenen Elektrofermentationen wurden der pH-Wert, die Leitfähigkeit, die optische Dichte und die Zellzahl jeweils vor und nach einem Versuchsabschnitt an Tag 3, 10 und 17 bestimmt. Der Druck sowie die Gaszusammensetzung wurden gemäß der obigen Beschreibung gemessen. Die aufgenommen physikochemischen Daten sind im Anhang dargestellt (ab Seite XXII). Die Werte der Gaszusammensetzungen und der Zellzahlen werden im folgenden Kapitel erläutert.

Der pH-Wert wurde zu Beginn der Elektrofermentation auf einen Wert zwischen 7,0 und 7,5 eingestellt, da dies der optimale pH-Bereich für die verwendeten Methanogenen ist. Der pH-

Wert in der Kathodenseite pendelte sich bei allen Versuchen zum Ende der Elektrofermentation auf einen pH-Wert von 7,5 ein. Auf der Anodenseite fiel der pH-Wert jedoch meist auf einen weitaus saureren Bereich von 2,0 bis 5,0 ab. Diese pH-Wert-Änderungen sind durch die Versauerung bzw. der Alkalisierung der Anoden- und Kathodenseite, wie in Kapitel 2.2.6 beschrieben, zu begründen [100,160]. Auf der Anodenseite werden durch das Anlegen einer Spannung elektrochemische Reaktionen katalysiert, welche zur Bildung von Protonen und Sauerstoff führen. Auf der Kathodenseite steigt der pH-Wert aufgrund der Bildung von Hydroxidionen [48]. Eine starke und damit hemmend auf die Methanogenen wirkende Erhöhung des pH-Wertes trat in den Versuchen aufgrund des verwendeten MOPS-Puffers nicht auf. Die Alkalisierung verursachte einen pH-Anstieg bis unterhalb der Schwelle von einem pH-Wert von 7,6. Bei einem Anstieg des pH-Wert über 7,6 hätten die methanogenen Kulturen gehemmt werden können [33,48].

Eine weitere wichtige Größe für die optimale Ausbeute und Effizienz einer elektrochemischen Reaktion ist die elektrische Leitfähigkeit des Mediums [48,161]. Diese beschreibt, wie schnell die Elektronen von der Kathode zur Anode fließen können. Auf beiden Seiten der H-Zellen blieb die Leitfähigkeit innerhalb der ersten Woche (Tag 3 – 10, -300 mV) der Elektrofermentation mit einem Wert von rund 18 mS/cm gleich. Beim letzten Messpunkt des gesamten Versuchs an Tag 17, beim Ende des Abschnittes mit -700 mV, stieg die Leitfähigkeit leicht auf 22 mS/cm in allen angeimpften Reaktoren und abiotischen Referenzen an. Dieser Anstieg ist durch die steigende Konzentration von gelösten Hydrogencarbonaten zu erklären. Während bei dem Versuchsabschnitt mit einem Potential von -300 mV keine Änderung der optischen Dichte in den beimpften Reaktoren festzustellen war, stieg diese bei einem Potential von -700 mV leicht an, von $OD_{600nm} = 0,25$ auf $OD_{600nm} = 0,32$. Dieser Anstieg ist teilweise durch das Wachstum der Methanogenen zu begründen. Jedoch kann die optische Dichte nicht für eine eindeutige Bestimmung des Wachstums genutzt werden, da das Medium im Laufe der Fermentation Ausfällungen bildet, die den Wert der optischen Dichte beeinflussen. Die genaue Zellzahl wurde daher mittels mikroskopischer Untersuchungen festgestellt.

Der Druck schwankte über die Zeit der gesamten Elektrofermentation in allen H-Zellen leicht. Dies ist durch die manuelle Zugabe des Gasgemisches ($N_2:CO_2$) und durch das Lösen von CO_2 im Medium zu erklären. In den Reaktoren mit Kulturen sank bzw. blieb der Druck selbst bei -700 mV nahezu konstant, da abiotisch entstandener Wasserstoff bzw. das zugesetzte CO_2 von den Methanogenen in Methan umgesetzt wurde. Ein etwas größerer Druckanstieg konnte lediglich auf den Kathodenseiten der beiden Referenzen bei einem Potential von -700 mV festgestellt werden. Dieser Anstieg auf bis zu 1 bar_{relativ} ist durch die Bildung von elektrolytisch

gebildetem Wasserstoff zu begründen, der in den zellfreien Referenzen nicht verstoffwechselt wurde.

5.2.2 Chronoamperometrische Messungen

Ein Anwendungsfeld der Elektromethanogenese könnte die Aufwertung von Rohbiogas (50-60% Methan, 40-50 % CO₂) zu fast 100 % Biomethan sein [3]. Bei der biologischen Methanisierung, wie sie zum Teil bisher für die Aufwertung von Rohbiogas Anwendung findet, wird Wasserstoff über einen Elektrolyseur hergestellt und in den entsprechenden Reaktor eingeleitet. Mittels der Elektromethanogenese soll dieser Schritt umgangen werden. Bei einem Potential von -300 mV stehen den Methanogenen Protonen und Elektronen zur Verfügung, welche für die Methanproduktion genutzt werden können. Bei einem Potential von -700 mV wird zunächst Wasserstoff an der Elektrode erzeugt und von den Methanogenen aufgenommen. Ziel des hier beschriebenen Experimentes ist es, zu klären, unter welchen der beiden Bedingungen die effektivste Methanproduktion innerhalb der Elektromethanogenese erzielt werden kann.

5.2.2.1 *Elektrofermentation bei -300 mV*

Für die Untersuchung einer möglichen direkten Elektromethanogenese wurde ein Potential von -300 mV gewählt. In einem Potentialbereich zwischen -210 mV und -409 mV wird zwar die Methanogenese ermöglicht, jedoch findet keine Wasserstoffproduktion ($E_0 = -410$ mV) statt.

Die Elektrofermentation bei -300 mV zeigte bei allen verwendeten Kulturen ein ähnliches Verhalten, siehe Abbildung 13. Bei allen Fermentationen startete die Stromdichte im positiven Bereich. Der starke Abfall der Stromdichte unmittelbar im Anschluss nach dem Start ist mit der Ausbildung einer elektrochemischen Doppelschicht an der Elektrode zu erklären [115]. Anschließend fielen die Stromdichten von 0 mA pro m² Elektrodenoberfläche (mA/m²) gleichmäßig auf eine Stromdichte von -10 mA/m² ab und blieben über den Langzeitversuch von 72 h hinweg konstant. Dabei waren keine starken Unterschiede zwischen den Referenzen und den jeweiligen Kulturen zu erkennen.

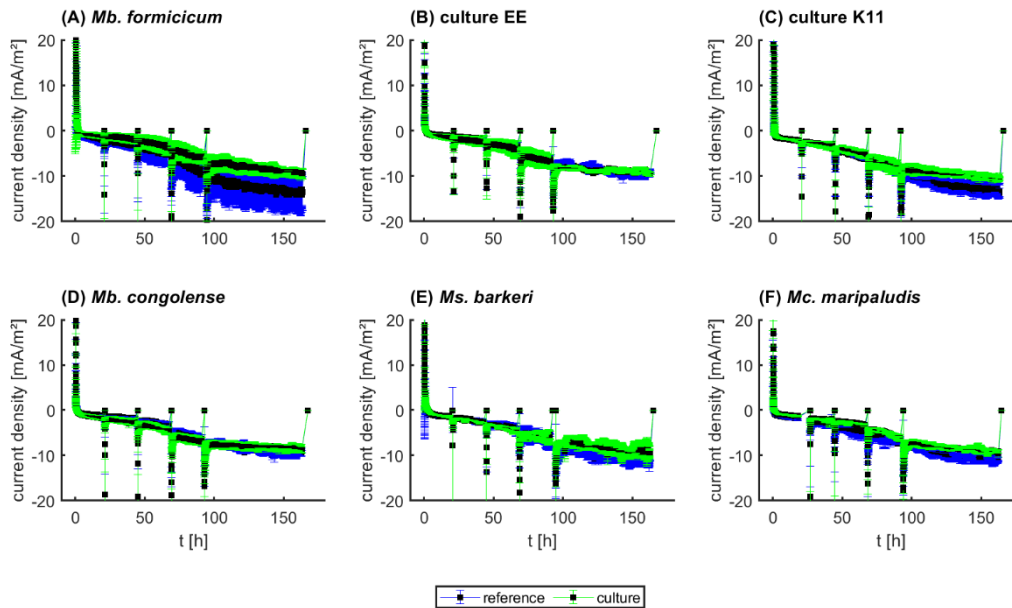


Abbildung 13 Chronoamperometrische Messungen der Elektrofermentationen bei -300 mV . Die blauen Kurven repräsentieren den Mittelwert der Referenzen ($n = 2$) und die grünen Kurven den Mittelwert der methanogenen Kulturen (mindestens 2 Reaktoren). Die Unterbrechungen in der Stromdichte sind bedingt durch die Probenahmen, da hier das System vom Potentiostaten getrennt wurde. (A) *Mb. congolense*, (B) *Mb. formicicum*, (C) *Ms. barkeri*, (D) Kultur EE, (E) Kultur K11, (F) *Mc. maripaludis*

5.2.2.2 Elektrofermentation bei -700 mV

Die indirekte Elektromethanogenese ist ein zweistufiger Prozess in dem zunächst Wasserstoff an der Elektrode gebildet wird. Ein Potential von -700 mV wurde gewählt, da in diesem Bereich nachweislich durch Vorversuche und die parallel geführten Referenzen bestätigt eine Elektrolyse des Wasserstoffes stattfindet ($\text{H}^+ + 2\text{ e}^- \rightarrow \text{H}_2$; $E_0 = -410\text{ mV}$). Dies bedeutet, dass in diesen Spannungsbereichen eine indirekte Elektromethanogenese ablaufen kann, d.h. ein zweistufiger Prozess in dem zunächst eine Wasserstoffproduktion via Elektrolyse (HER, Hydrogen Evolution Reaktion) stattfindet. Der Wasserstoff wird anschließend mit dem vorhandenen Kohlenstoffdioxid in Methan von den jeweilig genutzten Methanogenen umgewandelt [43,46,47].

In Abbildung 14 sind die Elektrofermentationen der verschiedenen Kulturen einzeln dargestellt. Die Referenzen zeigten im Vergleich zu den Kulturen einen stärkeren Abfall der Stromdichte auf bis zu -2000 mA/m^2 . Dieser starke Abfall ist durch die schnell ablaufende Reaktion der Wasserstoffbildung zu erklären. Battle-Vilanova *et al.* 2014 beobachtete ein ähnliches Verhalten: In den abiotischen Kontrollen konnte eine bis zu 5-fach höhere Stromdichte gemessen werden als in den biotischen Versuchen [162].

Die Kulturen erreichten durchschnittlich eine Stromdichte von ca. -500 mA/m^2 . In den Kulturen K11 und *Mc. maripaludis*, Abbildung 14 (E) und (F), fiel die Stromdichte zum Ende des Langzeitversuches nach 72 h auf -800 mA/m^2 ab. Diese Ergebnisse decken sich mit denen mehrerer unterschiedlicher Publikationen [43,163,164].

Das beschriebene Verhalten der Stromdichten kann folgendermaßen erklärt werden: In den abiotischen Kontrollen werden alle verfügbaren Elektronen und Protonen nur für die Synthese von Wasserstoff genutzt. Diese im Vergleich zur Elektromethanogenese relativ schnellen Reaktionen bedingen eine niedrige Stromdichte, wohingegen die Passivierung der Elektrode durch die Methanogenen in den beimpften Reaktoren die Abgabe der Elektronen mindert [162]. In den biotischen Reaktoren wird der Wasserstoff direkt über die Zellen aufgenommen und in Methan umgewandelt. Dabei werden die Elektronen nicht nur für die Umwandlung von CO_2 in CH_4 genutzt, sondern ebenfalls für das Zellwachstum, siehe Kapitel 5.2.6..

Bei der Elektrofermentation von *Mb. formicicum*, Abbildung 14 (A) weicht die erzielte Stromdichte von den Referenzen stark von den anderen Stromdichten ab. Ein Grund für den starken Abfall könnte das in einer leichten Variation angesetzte Medium gewesen sein. Bei der Herstellung des Mediums wurde dieses versehentlich erhitzt. Das Medium wurde trotzdem als Medium für die Kultivierung verwendet.

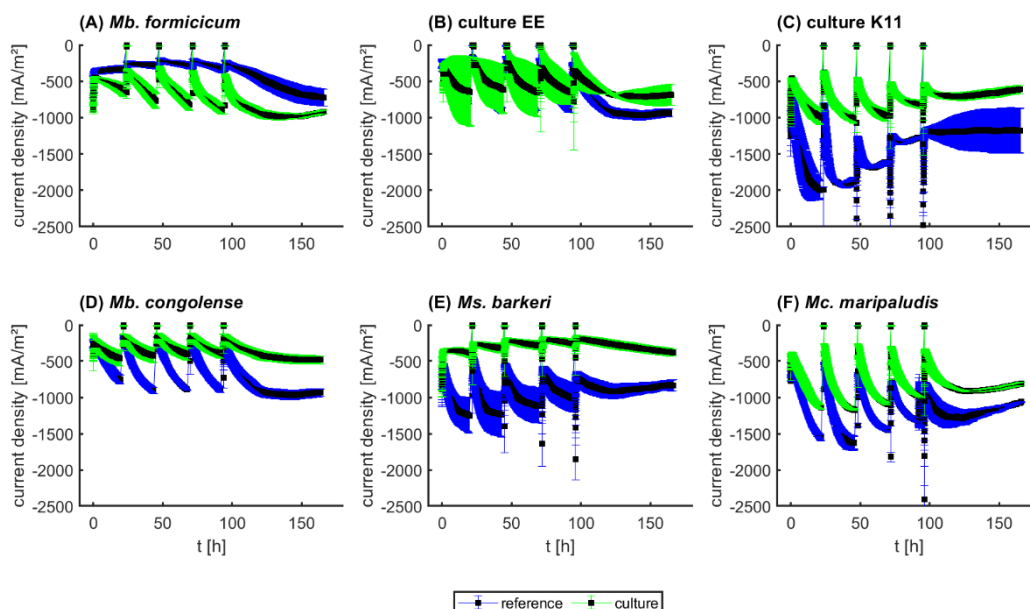


Abbildung 14 Chronoamperometrische Messungen der Elektrofermentationen bei -700 mV . Die blauen Kurven repräsentieren den Mittelwert der Referenzen ($n = 2$) und die grünen Kurven den Mittelwert der Kulturen (mindestens 2 Reaktoren). Die Unterbrechungen in der Stromdichte sind bedingt durch die Probenahmen, da hier das System vom Potentiostaten getrennt wurde. (A) *Mb. congolense*, (B) *Mb. formicicum*, (C) *Ms. barkeri*, (D) Kultur EE, (E) Kultur K11 und (F) *Mc. maripaludis*

Die chronoamperometrischen Messungen zeigten, dass bei einem Potential von -300 mV kein wesentlicher Strom geflossen ist. Es konnte kein Unterschied zwischen den abiotischen und biotischen Ansätzen beobachtet werden.

Bei einem Potential von -700 mV wurde eine höhere Stromdichte in den Referenzen gemessen, da in diesen Reaktoren ausschließlich Wasserstoff produziert wurde, siehe folgendes Kapitel. In den Reaktoren mit den jeweiligen genutzten Methanogenen fand aller Wahrscheinlichkeit eine Passivierung der Kathodenoberflächen statt, welche zu einer höheren Stromdichte führte.

5.2.3 Methan- und Wasserstoffkonzentrationen

Während den Elektrofermentationen bei -300 mV und -700 mV wurde täglich und nach den Langzeitversuchen (72 h) die Gaszusammensetzung des Kopfraumes der jeweiligen Kathoden- und Anodenseite bestimmt, siehe Abbildung 15. In allen Versuchsansätzen konnte bei einem Potential von -300 mV keine Wasserstoff- und Methanbildung nachgewiesen werden. Es wurde lediglich ein asymptotischer Abfall zu 0 mmol/m² für beide Gase festgestellt. Bei einem Potential von -700 mV dagegen wurde je nach verwendeter methanogener Kultur Wasserstoff in unterschiedlichen Konzentrationen nachgewiesen. Die gemessenen Werte des nicht mikrobiell umgesetzten Wasserstoffs erreichten bei *Mb. congolense* eine in etwa gleichbleibende tägliche Menge von 40 mmol/m², bei *Mb. formicium* von 120 mmol/m² und bei *Ms. barkeri* von 30 mmol/m² (innerhalb der 24 h-Messungen). Bei den isolierten Kulturen K11 und EE wurden im Verlauf der 24 h-Messungen sinkende Wasserstoffkonzentrationen gemessen: für K11 von 192 zu 80 mmol/m² und für EE von 82 zu 18 mmol/m² (innerhalb von 96 h). Bei *Mc. maripaludis* wurde in den ersten 24 h-Zeitraum zunächst eine Wasserstoffkonzentration von 145 mmol/m² gemessen, welche in den darauffolgenden Tagen unter die Nachweisgrenze fiel, was auf eine vollständige Umsetzung des gebildeten Wasserstoffs hindeutete.

Nach dem Langzeitversuch (-700 mV, 72 h) konnte bei *Mb. congolense* die 4-fache Menge an nicht umgesetzten Wasserstoff im Kopfraum des Reaktors nachgewiesen werden. Bei *Mb. formicium* und *Ms. barkeri* blieb die Wasserstoffkonzentration auf einem ähnlichen Niveau wie vor dem Langzeitversuch. Bei den Kulturen K11 und EE wurden innerhalb der 72 h-Zeiträume vermehrt Wasserstoff umgesetzt, so dass dessen Konzentration auf 8 bzw. 62 mmol/m² sank.

Bei der Betrachtung der Methanproduktion von *Mb. congolense* konnten im Durchschnitt 9 mmol/m² innerhalb von 24 h gemessen werden. Bei dem Langzeitversuch wurde eine

3,5-fache Erhöhung der Methanproduktion von 9 auf 27 mmol/m² erreicht. *Mb. formicicum* zeigte einen Anstieg der Methanproduktion von 1 auf 16 mmol/m² während der täglichen Beprobung nach insgesamt 96 h. Innerhalb des Langzeitversuchs über 72 h konnte ein Anstieg der Methanproduktion von 16 auf 78 mmol/m² gemessen werden. *Ms. barkeri* erzielte eine durchschnittliche tägliche Methanproduktion von 10 mmol/m² und die Methanproduktion erhöhte sich um das 5-fache auf 52 mmol/m² nach 72 h.

Bei der Kultur EE, Abbildung 15 (B), konnte eine kontinuierliche Abnahme der Menge an nicht zu Methan umgesetzten Wasserstoffs von 82 mmol/m² auf 18 mmol/m² gemessen werden. Diese Verringerung des Wasserstoffgehaltes im Kopfraum war proportional zur steigenden Menge an gebildetem Methan von 1 auf 30 mmol/m². Nach 72 h stieg die Methanproduktion um das 4-fache von 30 auf 136 mmol/m² an, dabei wiederum sank der Gehalt an Wasserstoff von 18 mmol/m² auf 8 mmol/m².

Die Kultur K11 (Abbildung 15 (C)) zeigte ein ähnliches Verhalten wie EE: Die Wasserstoffkonzentration nahm innerhalb der ersten vier täglichen Messungen von 191 auf 80 mmol/m² ab und erniedrigte sich über den Langzeitversuch weiter auf 62 mmol/m². Dagegen stieg die Methanproduktion in der täglichen Messung von 6 mol/m² auf 41 mmol/m². Nach 72 h konnte die 4-fache Menge an Methan pro m² Elektrodenoberfläche mit 165 mmol/m² gemessen werden.

Bei der elektrochemischen Kultivierung von *Mc. maripaludis* wurde eine Menge an nicht verstoffwechselten Wasserstoff von 145 mmol/m² zu Beginn der Elektrofermentation bei -700 mV gemessen, siehe Abbildung 15 (F). Nach dem zweiten 24 h Versuchsintervall betrug die Menge an Wasserstoff nur noch 2,0 mmol/m². In den darauffolgenden Messungen konnten nur noch minimale 0,2 bzw. 0,1 mmol/m² (nach III. 24 h bzw. IV. 24 h) an Wasserstoff im Kopfraum nachgewiesen werden. Die Methankonzentration stieg von 6 mmol/m² bei der ersten Messung (1. 24 h) auf 63 mmol/m² (2. 24 h) an. In den darauffolgenden täglichen Messungen blieb die Methankonzentration durchschnittlich bei 60 mmol/m² (3. und 4. 24 h). In vergleichbaren Publikationen konnten tägliche Methanproduktionsraten von 11 mmol/m² und 16 mmol/m² mit *Mc. maripaludis* erreicht werden [55,69]. Nach 72 h stieg die Methanproduktion um das 3-fache auf 199 mmol/m² an. Xia *et al.* konnte ebenfalls eine solche gute Verstoffwechslung des Wasserstoffes nachweisen, nachdem sich ein Biofilm an der Elektrode entwickelt hatte [164].

Bei den Kontrollexperimenten konnten in den jeweiligen beiden Referenzen eine Wasserstoffproduktion bei -700 mV beobachtet werden, siehe Abbildung 16. Es wurden Wasserstoffproduktionsraten von durchschnittlich 313 ± 43 mmol/m² jeden Tag gemessen. Im

Langzeitexperiment über drei Tage hinweg wurde in den Referenzen eine durchschnittliche Wasserstoffkonzentration von $840 \pm 288 \text{ mmol/m}^2$ erreicht.

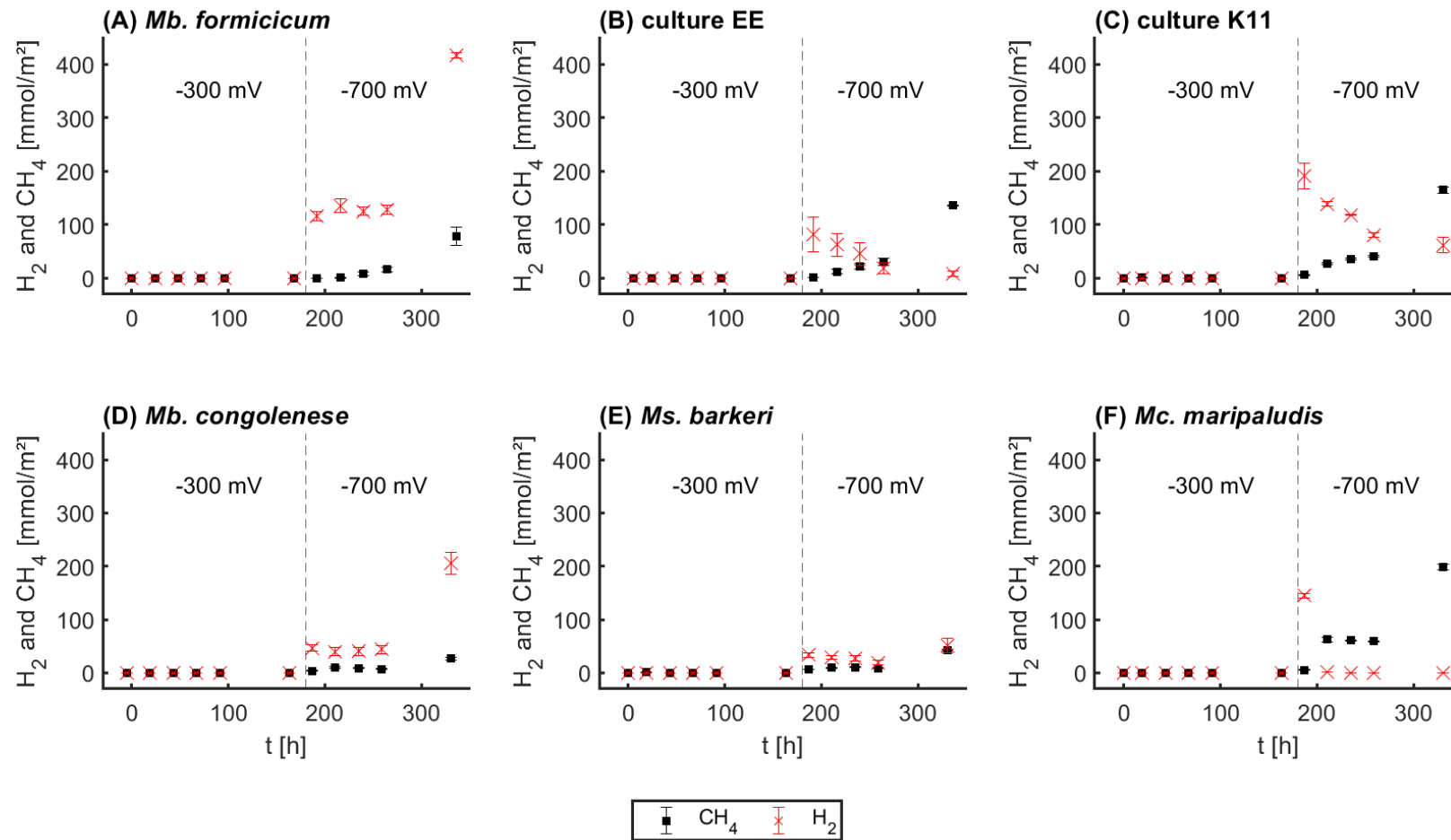


Abbildung 15 Methan- und Wasserstoffkonzentrationen in den Versuchsansätzen zur direkten und indirekten Elektromethanogenese bei zwei verschiedenen Potentialen von -300 und -700 mV. (A) *Mb. congolense*, (B) *Mb. formicicum*, (C) *Ms. barkeri*, (D) Kultur EE, (E) Kultur K11, (F) *Mc. maripaludis*

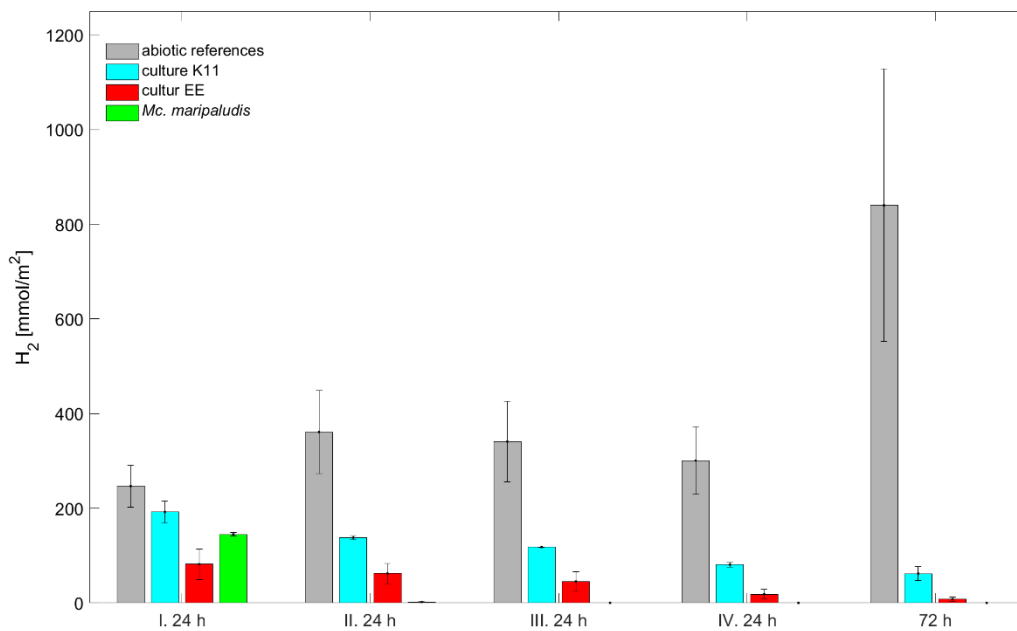


Abbildung 16 Vergleich der nachweisbaren Wasserstoffkonzentrationen in den Referenzzellen als Mittelwert (Anzahl $n=3$) im Vergleich zu den Mittelwerten der beimpften Reaktoren mit den Kulturen Kultur K11 (cyan), Kultur EE (rot) und *Mc. maripaludis* (grün). Diese Kulturen sind abgebildet, weil sie die höchste CE und Methanproduktion bei einem Potential von -700 mV erreichten. Der Unterschied in der Konzentration ist auf die Wasserstoffaufnahme und Umwandlung in Methan durch die Mikroorganismen zurückzuführen. Gezeigt wird hier die Wasserstoffmenge in mmol pro m^2 Kathodenoberfläche für je vier aufeinander folgende Messintervalle von je 24 h und einem Langzeitexperiment mit 72 h.

5.2.4 Zellzahlen

Neben der täglichen Bestimmung der Methan- und Wasserstoffkonzentrationen wurden ebenfalls die Zellzahlen der verwendeten Kulturen bestimmt. Bei den meisten Kulturen konnte ein leichter Anstieg der Zellzahl von Beginn bis zum Ende der Elektrofermentation beobachtet werden. Die Kultur *Mc. maripaludis* verdreifachte ihre Zellzahl bis zum Ende des Versuchsdurchlaufes. Bei einem Potential von -300 mV konnte mehrmals beobachtet werden, dass die Zellzahl der verschiedenen Kulturen konstant blieb bzw. leicht sank. Dies weist vermutlich auf eine Art Ruhemodus der jeweilig genutzten Kultur hin. Die genauen Zellzahlen sind in der Tabelle 24 dargestellt.

Tabelle 24 Zellzahl der einzelnen Kulturen beim Start und jeweils am Ende der Langzeitversuche mit den verschiedenen Potentialen.

Organismen	Start Zellen pro mL	-300 mV Zellen pro mL	-700 mV Zellen pro mL
<i>Mb. congolense</i>	$6,1 \times 10^6 \pm 1,7 \times 10^6$	$2,8 \times 10^6 \pm 7,6 \times 10^5$	$3,6 \times 10^6 \pm 9,4 \times 10^5$
<i>Ms. barkeri</i>	$1,4 \times 10^7 \pm 4,3 \times 10^5$	$1,2 \times 10^7 \pm 1,6 \times 10^6$	$1,7 \times 10^7 \pm 6,2 \times 10^5$
<i>Mb. formicicum</i>	$1,4 \times 10^7 \pm 8,9 \times 10^6$	$9,0 \times 10^6 \pm 7,0 \times 10^4$	$2,1 \times 10^7 \pm 2,9 \times 10^6$
Kultur EE	$1,5 \times 10^7 \pm 3,0 \times 10^6$	$1,6 \times 10^7 \pm 7,4 \times 10^5$	$2,3 \times 10^7 \pm 5,2 \times 10^5$
Kultur 11	$1,1 \times 10^7 \pm 1,8 \times 10^6$	$9,8 \times 10^6 \pm 5,5 \times 10^5$	$1,7 \times 10^7 \pm 4,6 \times 10^6$
<i>Mc. maripaludis</i>	$1,5 \times 10^7 \pm 2,4 \times 10^6$	$4,1 \times 10^6 \pm 1,3 \times 10^6$	$4,4 \times 10^7 \pm 1,5 \times 10^6$

5.2.5 Direkte vs. indirekte Elektromethanogenese

Der Vergleich der beiden unterschiedlich wirkenden Potentiale zeigte, dass bei einem Potential von -300 mV keine wesentliche mikrobielle Aktivität vorlag. Dies ist ebenfalls an der sinkenden bzw. gleichbleibenden Zellzahl zu erkennen. Des Weiteren konnte keine Methanproduktion innerhalb dieses Versuchszeitraumes festgestellt werden, sondern lediglich ein Absinken der Methankonzentration durch das tägliche Spülen des Kopfraumes. Aulenta *et al.* 2011 und Blanchet *et al.* 2015 konnten ebenfalls keine Methanproduktion bei einem Potential von -250 mV und -360 mV nachweisen [123,124].

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass keine direkte Elektromethanogenese bei den verwendeten Kulturen stattfand bzw. nur eine sehr geringe Stoffwechselaktivität an den Elektroden vorlag. Jedoch konnte eine direkte Elektromethanogenese nicht komplett ausgeschlossen werden. Lohner *et al.* 2014 bewiesen mit einer Deletionsmutante, dass eine direkte Elektromethanogenese möglich ist. Jedoch erreichte diese Mutante ohne die Möglichkeit einer Wasserstoffaufnahme in seinem Versuch über 150 h lediglich eine Menge von $6 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ an Methan. Bei dem Versuchsorganismus handelte es sich um einen *Methanococcus maripaludis* Stamm, in welchem die Hydrogenasen deletiert wurden und so keine Aufnahme von Wasserstoff mehr stattfinden konnte [122].

Bei einem Potential von -700 mV konnte bei allen Kulturen ein Anstieg sowohl der Zellzahl als auch der Methanproduktion gemessen werden. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die Wasserstoffkonzentration in Abhängigkeit vom verwendeten Mikroorganismus unterschiedlich stark sank. Diese Versuche sowie verschiedene Reviews und Publikationen bestätigen, dass für eine ausreichend hohe Methanproduktion die indirekte Elektromethanogenese, d. h. ein zweistufiger Prozess vorhanden sein muss, welcher im ersten

Schritt abiotischen Wasserstoff benötigt, um im zweiten Schritt mikrobielles Methan zu produzieren [36,44,46,163,165–167]. Daraus folgt, dass die Elektromethanogenese, wie diese in verschiedenen Publikationen dargestellt wird, eher einer biologischen *in-situ* Methanisierung ähnelt als dem direkten an der Elektrode stattfindenden Elektronentransfer [35,121,122,164]. Zu einem vergleichbaren Ergebnis führte die Arbeit in einer Microbial Fuel Cell mit einer *Clostridium ljungdahlii* Kultur [91].

5.2.6 Bilanzierung der chronoamperometrische Messungen

Die Bilanzierung der Elektromethanogenese erfolgt über die Coulombsche Effizienz (CE) und beschreibt die Effizienz, mit der der eingesetzte Strom in Methan umgesetzt wurde [70,168,169].

Die CE der oben beschriebenen Versuche bei -700 mV wird in Abbildung 17 grafisch dargestellt. Bei allen Kulturen ist bei der täglichen Messung ein kontinuierlicher Anstieg der CE zu erkennen. Bei den Kulturen EE, K11 und *Mc. maripaludis* wurden nach dem Langzeitversuch jeweils eine CE von 64 %, 75 % bzw. 74 % erreicht. Ähnliche CE Werte wurden in verschiedenen Publikationen beschrieben [55,69,161].

Bei der Betrachtung der CE sticht vor allem die Kultur *Mc. maripaludis* heraus, da diese bereits nach der zweiten Tagesmessung eine CE von 66 % erreichte und bis zum Ende des Versuches nur noch ein leichter Anstieg der CE festgestellt werden konnte. Der starke anfängliche Anstieg der CE kann durch die schnelle Verdopplungszeit von 2 h von *Mc. maripaludis* erklärt werden. Durch das schnelle Wachstum kann der entstehende Wasserstoff sofort in Methan umgesetzt werden, siehe Abbildung 15. Aus diesem Grund verblieb nur eine geringe Wasserstoffkonzentration im Kopfraum, siehe Abbildung 16. Die Kulturen von *Mb. congolense*, *Mb. formicicum* und *Ms. barkeri* erwiesen sich dagegen als nicht geeignet für eine weitere Untersuchung der indirekten Elektromethanogenese, da diese, trotz genügend zur Verfügung stehenden Wasserstoffes, nur eine CE von ~45 % erreichten [55]. In der Tabelle 25 sind die Kenndaten der jeweiligen Kultivierung zusammenfassend dargestellt.

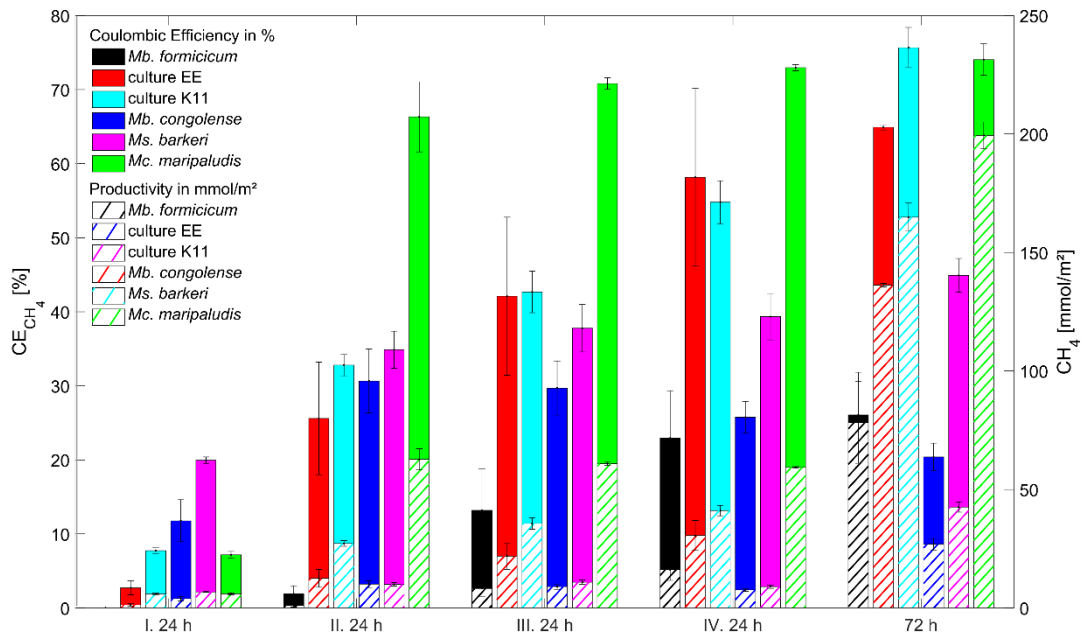


Abbildung 17 Darstellung der Coulombschen Effizienz von Methan (einfarbig) im Vergleich zur Methanproduktion (gestreift) der Elektrofermentation der methanogenen Kulturen bei -700 mV

Tabelle 25 Zusammenfassung der Coulombschen Effizienzen und weiterer Parameter der Elektrofermentation bei -700 mV nach dem Langzeitversuch von 72 h

Organismus	mA h	CE CH ₄ %	CH ₄ mmol/m ⁻²
<i>Mb. formicicum</i>	67,2 ± 2,8	26,0 ± 5,7	78,3 ± 17,3
Kultur EE	53,2 ± 8,8	64,9 ± 0,4	136,3 ± 0,7
Kultur 11	48,8 ± 3,0	75,6 ± 2,7	164,9 ± 5,9
<i>Mb. congolense</i>	29,5 ± 3,6	20,4 ± 1,8	26,9 ± 2,4
<i>Ms. barkeri</i>	21,2 ± 3,4	44,9 ± 2,3	42,5 ± 2,2
<i>Mc. maripaludis</i>	60,3 ± 0,2	74,0 ± 2,1	199,4 ± 5,7

5.2.7 Rasterelektronenmikroskopie der Kathoden

Neben der quantitativen Erfassung der Zellen im Medium kann eine Betrachtung der Kathodenoberfläche Hinweise auf einen eventuellen Biofilmbasierten Prozess geben. Für die Aufnahmen mittels eines Rasterelektronenmikroskops wurden die Elektroden zunächst mit Glutaraldehyd fixiert und anschließend mit einer Ethanolreihe getrocknet. Die Kultur von *Mc. maripaludis* wurde zusätzlich mit Gold zu Erhöhung der elektrischen Leitfähigkeit besputtert. Die Abbildung 18 zeigt die Aufnahmen der Kathodenoberflächen nach den Versuchen in den kleinen H-Zellen. Die aus Graphit bestehende Kathodenoberfläche ist stark zerklüftet. Des

Weiteren sind verschiedene Kristallstrukturen auf der Oberfläche erkennbar, welche wahrscheinlich durch die verwendeten Medienbestandteile entstanden sind [162]. *Mb. congolense*, *Ms. barkeri* und *Mb. formicicum* zeigen nur einen geringen Bewuchs der Elektrodenoberflächen. Im Gegensatz dazu sind die Elektroden der Kultur EE, der Kultur K11 und *Mc. maripaludis* sehr stark bewachsen. Diese letzten drei genannten Kulturen zeichnen sich durch deren hohe CE, die hohe Methanausbeute sowie die niedrigere Stromdichte von bis zu -800 mA/m^2 aus. Im Vergleich dazu erreichte z. B. *Mb. congolense* nur eine Stromdichte von -500 mA/m^2 . Die Bildung eines dichten Biofilms mit damit einhergehender hoher Produktivität des Systems konnte ebenfalls in anderen Publikationen beobachtet werden [69,103,162,170]. Basierend auf diesen Ergebnissen liegt folgende Schlussfolgerung nahe: Durch die physikalische Nähe der Methanogenen zu der Elektrode wird besser bzw. direkt Wasserstoff aufgenommen, welcher dann in Methan umgesetzt werden kann.

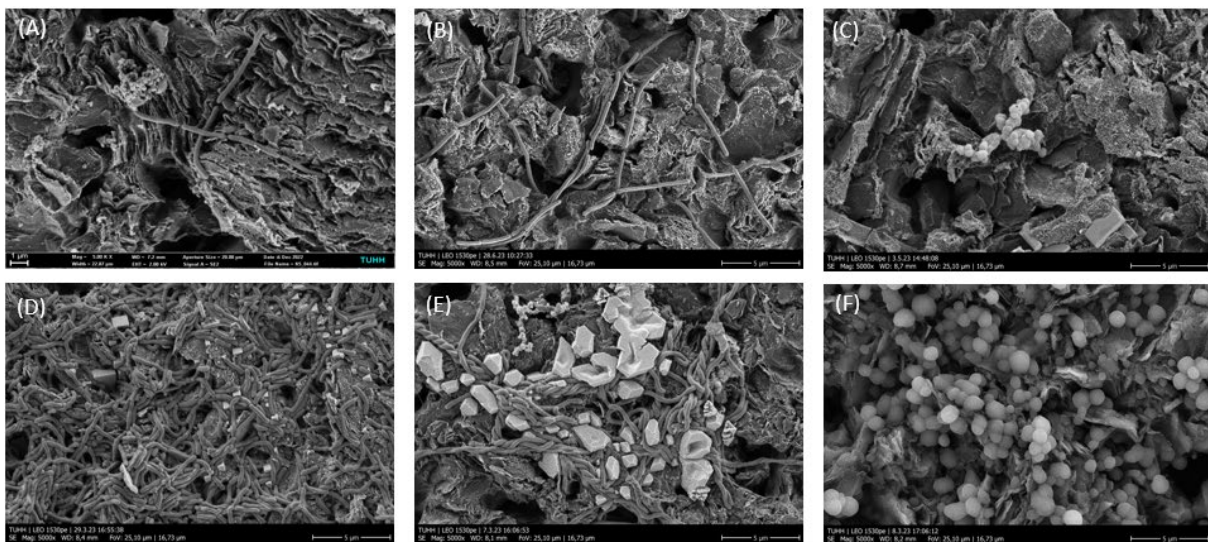


Abbildung 18 REM-Aufnahmen der Elektrodenoberflächen (Kathoden) nach der jeweiligen Elektrofermentation bei -700 mV . (A) *Mb. congolense*, (B) *Mb. formicicum*, (C) *Ms. barkeri*, (D) Kultur EE, (E) Kultur K11, (F) *Mc. maripaludis*. Die Kathoden von *Mc. maripaludis* wurde zusätzlich mit Gold für eine höhere Leitfähigkeit der Elektrodenoberfläche besputtert.

5.2.8 Fazit der Experimente in den kleinen H-Zellen

In den hier beschriebenen Versuchen wurde das elektroaktive Verhalten von sechs verschiedenen Methanogenen bei Potentialen von -300 mV und -700 mV untersucht. Bei -300 mV sollte die direkte Elektromethanogenese ermöglicht werden, d.h. eine Reduzierung von Kohlenstoffdioxid in Methan, mittels Elektronen von der Kathode und Protonen aus dem umgebenden Medium. Bei einem Potential von -300 mV wurde sichergestellt, dass kein Wasserstoff abiotisch produziert wurde, aber eine Methanogenese

stattfinden konnte. Die Ergebnisse der kleinen H-Zell-Reaktoren zeigten, dass bei einem Potential von -300 mV keine messbare mikrobielle Aktivität vorlag. Dieses belegt, dass die direkte Elektromethanogenese ein eher ineffizienter und somit derzeit ein ungeeigneter Stoffwechselweg für die industrielle Nutzung darstellt. Die Ineffizienz der direkten Elektromethanogenese bestätigten ebenfalls Lohner *et al.* 2014 mit einer Hydrogenase-Deletionsmutante [122].

Ab einem Potential von < -410 mV kann elektrochemisch Wasserstoff gebildet werden. Für die hier beschriebenen Experimente wurde ein Potential von -700 mV verwendet, da ab diesem Potential ausreichend Wasserstoff gebildet werden konnte, basierend auf eigene Referenzmessungen und [123,163,171]. Bei allen Versuchen wurde z. T. eine vollständige Umwandlung von Wasserstoff in Methan beobachtet sowie ein Anstieg der Zelldichte an Methanogenen.

Mit den isolierten Kulturen EE und K11 konnte jeweils eine höhere CE und Methanproduktion, von mehr als 50 % als bei der verwendeten Reinkultur von *Mb. formicicum* erreicht werden. Die spannungsbasierte Isolierungsmethode führte dabei allerdings zu keiner höheren Effektivität in Bezug auf die Methanproduktion im Vergleich zur konventionellen Isolierung ohne Spannung. Die Unterschiede in der CE und Methanproduktion zwischen der Reinkultur und den Isolaten basieren wahrscheinlich auf den minimalen aber anscheinend signifikanten genetischen Differenzen, siehe Kapitel 5.1.3.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bei einem Potential von -300 mV die Methanogenen überleben bzw. in einen Ruhemodus verfallen und bei -700 mV die verwendeten Kulturen reaktiviert werden und aktiv Methan produzieren [164,171]. Diese Aktivität ist deutlich an der wachsenden Zellzahl und durch den Anstieg der Methankonzentration im Kopfraum der Reaktoren zu sehen. Aus diesem Grund ist nur die indirekte Elektromethanogenese, unterhalb eines Potentials von < -410 mV, für mögliche künftige industrielle Zwecke geeignet.

Durch die indirekte Elektromethanogenese bei einem Potential von -700 mV konnten Coulombsche Effizienzen zwischen 66 und 76 % erzielt werden. Diese wurden mit den isolierten Stämmen Mb. formicicum Stamm EE und Stamm K11 sowie Mc. maripaludis erreicht. Dabei bildete sich ein aktiver Biofilm auf der Kathode und es wurden tägliche Methanproduktionsraten von bis zu 67 mmol/m² erreicht.

In den folgenden Abschnitten wird die indirekte Elektromethanogenese auf deren systemdienliche Betriebsweise (intermittierende Stromproduktion) hin untersucht. Hierfür wurde die Kultur *Methanococcus maripaludis* verwendet, da diese die besten Ergebnisse zeigte. Diese Kultur wurde zunächst bei unterschiedlichen Potentialen auf ihr Optimum der Methanproduktion hin untersucht. Dieses Potential wurde anschließend genutzt, um einen simulierten Lastenwechsel einer Photovoltaik-Anlage zu simulieren.

5.3 Elektrochemische Versuche in der großen H-Zelle

In den oben beschriebenen Versuchen wurden unterschiedliche Methanogene auf deren Elektroaktivität hin untersucht. Die erfolgversprechendste Kultur wurde anhand der Kritikpunkte der besten Methanproduktion, der höchsten CE und dem dichtesten Biofilm an der Kathode gewählt. *Mc. maripaludis* zeigte bei diesen Kriterien überwiegend die besten Ergebnisse. Des Weiteren ist diese Kultur ebenfalls in ähnlichen Publikationen oft aufgrund ihrer Robustheit und ihres schnellen Wachstums genutzt worden [172,173].

In den folgenden Abschnitten wird ein eigens entwickelter größerer Reaktor verwendet. Der Vorteil dieses Systems ist die halbautomatisierte Bedienung im Gegensatz zu den kleinen H-Zell-Reaktoren, in denen die Gasproben manuell genommen wurden. Das größere Reaktorsystem ist ebenfalls H-Zell-förmig und hat ein Reaktionsvolumen von 350 mL, also eine 3,5-fache Vergrößerung im Vergleich zu den kleinen H-Zellen. Weiterhin ist der große Reaktor mit einer pH-Elektrode auf der Anoden- und der Kathodenseite versehen sowie einem Drucktransmitter auf der Kathodenseite. Wie auch die kleineren H-Zellen wurde der große Reaktor mit dem Minimalmedium M141 betrieben, siehe Tabelle 15. Die Temperatur wurde durch einen Doppelmantel während der Versuche konstant bei 38 °C gehalten. In den folgenden Kapiteln sind Versuche zur Ermittlung beschrieben, welche Potentiale (-300 mV, -700 mV, -800 mV und -900 mV) am besten für eine optimale Methanproduktion geeignet sind. Alle Potentiale sind in Bezug zu einer SHE zu verstehen.

5.3.1 Physikochemische Daten

Kontinuierliche Messungen des pH-Wertes und des Druckes erlauben es, den Prozess der Elektromethanogenese besser zu verstehen und gezielt steuern zu können. Durch die Messung des Druckes kann bestimmt werden, wieviel Gas im Medium gelöst wird. Mittels der kontinuierlichen pH-Messungen können die Wachstumsbedingungen der Kultur auf der Kathodenseite durch entsprechende Maßnahmen stabil gehalten und die begleitenden elektrochemischen Reaktionen der Anodenseite abgeschätzt werden.

In der Abbildung 19 ist der Verlauf des pH-Wertes der Anoden- und Kathodenseite der beiden großen H-Zellen dargestellt. In dem ersten Abschnitt wurden vor dem Animpfen die Reaktoren zunächst bei einem Potential von -700 mV über eine Zeit von ca. 100 Stunden reduziert. Ziel dieser Reduzierung war es, alle unspezifizierten Reaktionen zu beseitigen, damit in beiden Reaktoren die gleichen Bedingungen gewährleistet waren. Dabei stellte sich der pH-Wert auf beiden Seiten der Reaktoren auf 7,2 ein. Nach der Reduzierung wurden die Reaktoren beimpft.

Bei einem Potential von -300 mV waren innerhalb der Kultivierung keine starken Veränderungen in beiden Kompartimenten des jeweiligen Reaktors zu erkennen. Bei einem Potential von -700 mV wurde an der Kathodenseite Wasserstoff gebildet. Die benötigten Protonen für diese Reaktion werden aus dem Medium entnommen. Durch die entzogenen Protonen reichern sich Hydroxydionen im Kathodenbereich an. Aus diesem Grund stieg der pH-Wert auf bis zu 8 an. Auf der Anodenseite sank dagegen der pH-Wert von 7,2 auf ca. 6,6. In diesem Bereich werden durch die Oxidation des Wassers sowohl Sauerstoff als auch Protonen an der Elektrode frei, welche den Abfall des pH-Wertes im Medium verursachen [100,103].

Um eine Substratlimitierung des Kohlenstoffdioxids zu vermeiden, wurde bei einem Potential von -800 mV die Gaszusammensetzung von N₂:CO₂ (80:20) durch CO₂ (Reinheit 99,5 %) ersetzt. Zudem sollte durch einen höheren Anteil an gelöstem CO₂ der pH-Wert des Mediums stabilisiert werden. Der pH-Wert innerhalb der Kathodenseiten konnte nach dem Wechsel zu technischem CO₂ konstant auf einen Wert von 6,9 gehalten werden. Zum Ende des Experimentes (840 h) wurde die Gasphase auf N₂:CO₂ umgestellt. Durch die geringere Konzentration an CO₂ im N₂:CO₂ (80:20) Gasgemisch konnte ein pH-Sprung von 6,9 auf 7,2 beobachtet werden, da sich weniger CO₂ im Medium lösen konnte.

Auf der Anodenseite wurde kein CO₂ als Gasphase hinzugeführt, da auf dieser Seite keine Mikroorganismen verwendet wurden. Des Weiteren wurde die Anodenseiten geöffnet, um einen Druckausgleich zu garantieren und den entstehenden Sauerstoff in die Atmosphäre zu leiten. Im Vergleich zu einem Potential von -700 mV wurde bei -800 mV die Versäuerung der Anodenseite stark beschleunigt, auf einen pH-Wert von 1,6 nach 500 h. Anschließend fand ein langsamer Anstieg des pH-Wertes auf 4 bis zum Ende der Kultivierung statt. Dieser Anstieg ist durch den Verbrauch der Protonen in der Kathodenseite zu erklären, da hier kontinuierlich Wasserstoff produziert wurde. Die entstandenen Protonen der Anodenseite konnten durch die semipermeable Membran auf die Kathodenseite diffundieren und zusammen mit den Elektronen der Kathode Wasserstoff bilden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass sich das Medium im Laufe der Experimente veränderte, insbesondere auf der Anodenseite. Aus diesem Grund sollte in den nächsten Schritten auf eine kontinuierliche Prozessführung geachtet werden, damit immer eine ausreichend hohe Konzentration an Protonen im Medium auch auf der Kathodenseite vorhanden ist.

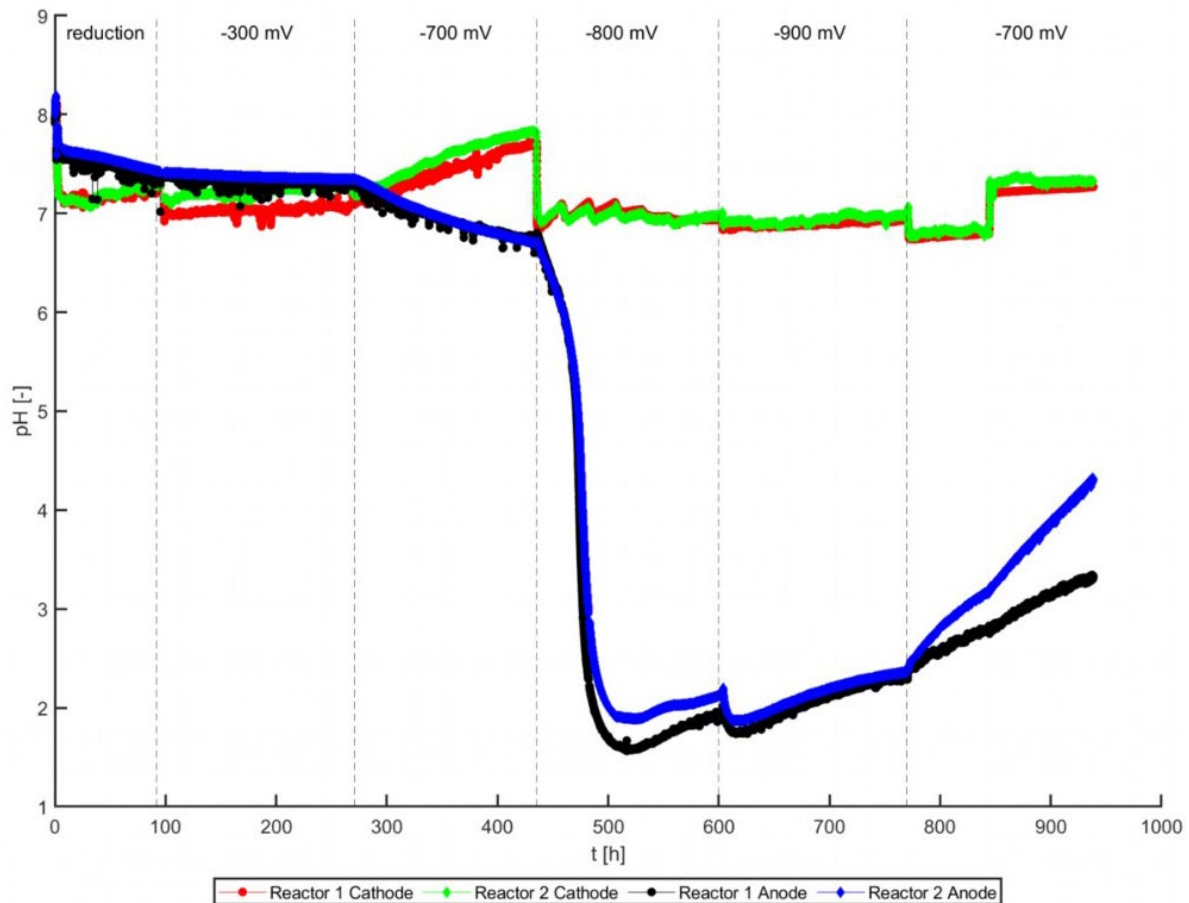


Abbildung 19 pH-Wert Messungen innerhalb der zwei großen H-Zellen bei verschiedenen Potentialen mit *Mc. maripaludis*

Neben dem pH-Wert wurde ebenfalls der Druck innerhalb der Kathodenbereiche der Reaktoren kontinuierlich gemessen, siehe Abbildung 20. Bis zu einem Potential von -700 mV wurde ein konstanter Druck von 100 mbar eingestellt, welcher leicht innerhalb von 24 h noch vor dem Animpfen abgefallen ist. Diese Verringerung des Druckes ist durch das Lösen von CO₂ im Medium zu erklären. Zu Beginn der Kultivierung bei einem Potential von -700 mV sank der Druck innerhalb eines Tages von 100 mbar auf 50 mbar ab. Dieser stärkere Abfall ist durch das Anwachsen der Kultur zu begründen, da in diesem Zeitraum für ein anfänglich verstärktes Wachstum ein erhöhter CO₂-Bedarf bestand. Anschließend wurde der eingestellte Druck von 100 mbar nicht unterschritten.

Ab einem Potential von -800 mV wurde von einem 20 %igen CO₂-haltigen Gas (N₂:CO₂) auf CO₂ (99,5 %) umgestellt. Dieses diente zur Regulierung des pH-Wertes und hatte eine Erhöhung der Methanproduktion zum Ziel. Das technische CO₂ löste sich zu einem größeren Teil im Medium als N₂:CO₂. Dadurch entstand in den ersten 24 Stunden bei einem Potential von -800 mV ein Unterdruck. Zum Schutz des Reaktors vor einer Implosion wurde der Druck

auf 500 mbar nachfolgend erhöht, wodurch ein weiterer starker Unterdruck nicht mehr auftreten konnte. Über den Kultivierungszeitraum hinweg löste sich immer weniger CO_2 im Medium, was auf ein Gleichgewicht zwischen CO_2 und HCO_3^- im Medium hindeutete.

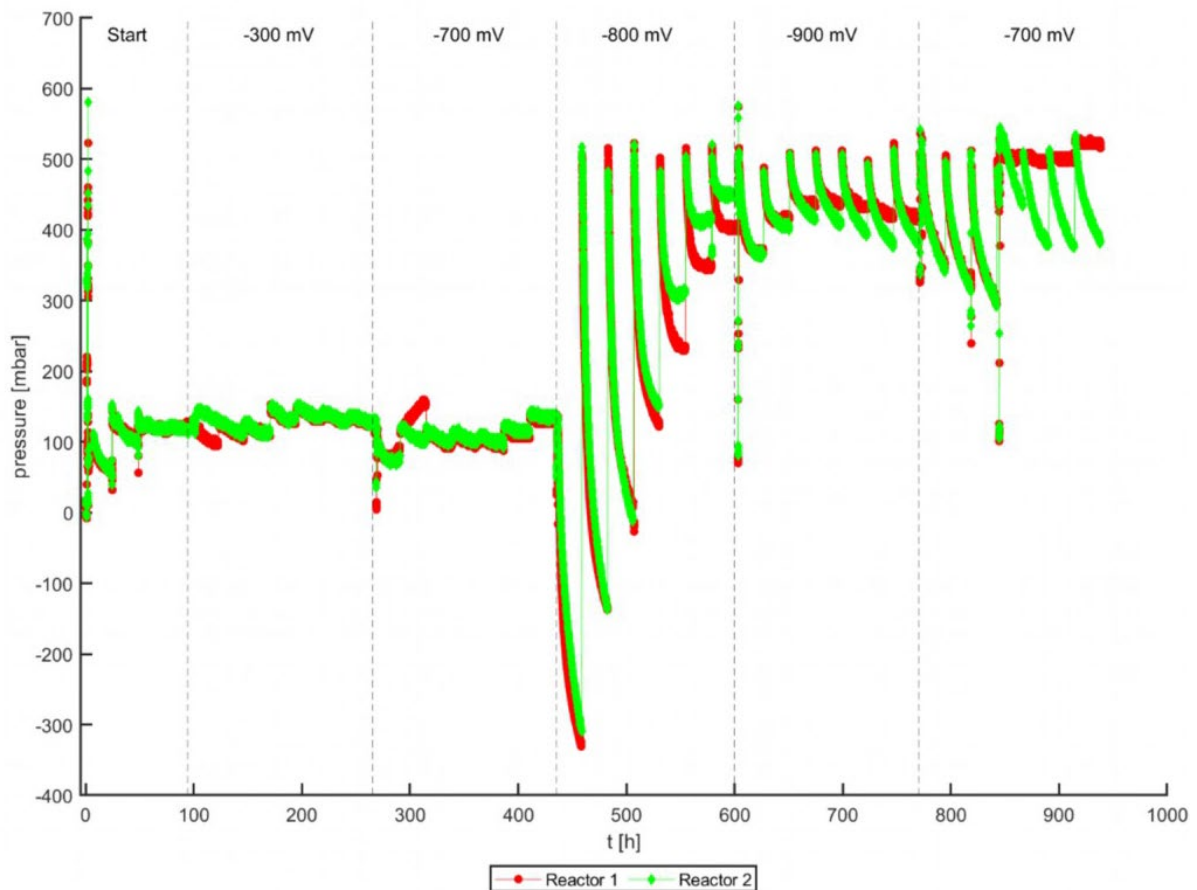


Abbildung 20 Druckverlauf innerhalb des Experiments in der zwei großen H-Zellen mit *Mc. maripaludis*. Die Sprünge im Druckverlauf sind durch die Probenahmen zu erklären

5.3.2 Chronoamperometrische Messungen

Anhand der chronoamperometrischen Messungen kann der Strom bestimmt werden, welcher benötigt wird, um das angelegte Potential konstant zu halten. In den großen H-Zellen wurden insgesamt vier verschiedene Potentiale eingestellt, um die bestmögliche Methanproduktion zu erhalten.

Bei dem ersten Potential von -300 mV mit $\text{N}_2:\text{CO}_2$, konnte, ähnlich wie bei den kleinen H-Zell-Reaktoren, keine wesentliche Änderung der Stromdichte beobachtet werden, siehe Abbildung 21 (A). Die Stromdichte fiel von 0 mA/m^2 auf -10 mA/m^2 ab. Diese Abnahme kann auf eine direkte Elektromethanogenese hinweisen, jedoch konnte bei den gaschromatographischen Analysen keine Methanproduktion nachgewiesen werden.

Unter den Bedingungen der indirekten Elektromethanogenese, bei -700 mV mit N₂:CO₂, konnte zu Beginn der Kultivierung ein Abfall der Stromdichte von -250 mA/m² auf -750 mA/m² beobachtet werden, siehe Abbildung 21 (B). Die Stromdichte stieg jedoch bis zum Ende der Kultivierung auf -500 mA/m² wieder an. Diese Veränderungen wurden zuvor ebenfalls in den kleinen H-Zellen beobachtet. Hier fiel die Stromdichte ebenfalls auf -800 mA/m² ab und pendelte sich bei -700 mA/m² ein. Die Stromdichten bei -300 mV und bei -700 mV sind damit sehr ähnlich zu den Stromdichten bei den kleinen H-Zell Reaktoren, siehe Kapitel 5.3.3.

Bei den höheren Potentialen in den großen H-Zellen von -800 mV und -900 mV mit CO₂ wurde jeweils eine Stromdichte von -2000 mA/m² gemessen, siehe Abbildung 21 (C) und (D). Jedoch trat bei diesen beiden Potentialen keine nachweisbare Methanproduktion mehr auf, siehe Abschnitt 5.3.3. Diese Hemmung der mikrobiellen Aktivität deutet darauf hin, dass eine Stromdichte von -2000 mA/m² zu tief ist, damit eine messbare Elektromethanogenese stattfinden kann und die methanogene Kultur eventuell sogar abstirbt.

Am 32. Tag der Kultivierung wurde zum „Wiederbeleben“ der Kultur erneut ein Potential von -700 mV angelegt. Jedoch konnten weder eine erneute Methanproduktion noch ein erhofftes Zellwachstum festgestellt werden. Am 35. Kultivierungstag wurde die Gasphase von nur CO₂ auf das Gemisch N₂:CO₂ umgestellt, um mit vorher vergleichbarere Bedingungen zu schaffen. Diese Umstellung konnte jedoch ebenfalls kein erneutes Anwachsen der Kultur hervorbringen. Bei dem erneut verwendeten Potential von -700 mV wurden Stromdichten von -400 mA/m² erreicht, ähnlich zu den Stromdichten zum Ende der Kultivierung im ersten Versuchsabschnitt mit einem Potential von -700 mV.

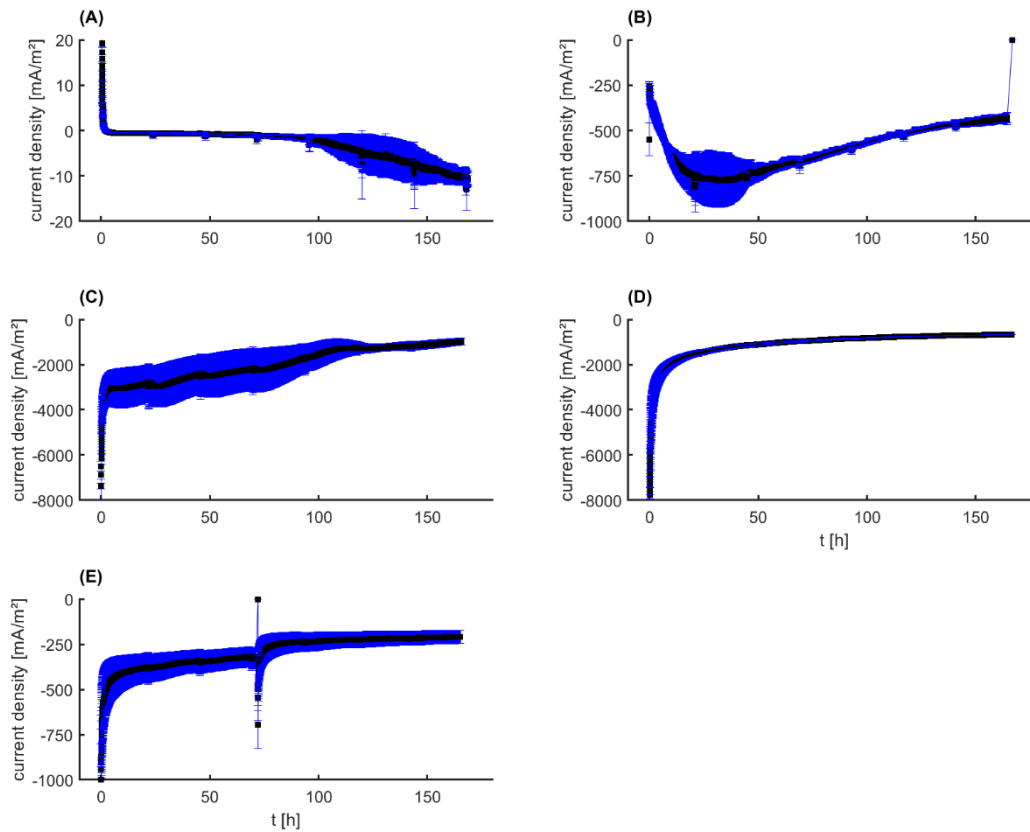


Abbildung 21 Chronoamperometrische Messungen in den großen H-Zellen. Für eine optimale Darstellung der Ergebnisse wurden unterschiedliche Skalierungen in den Diagrammen gewählt. (A) -300 mV mit $N_2:CO_2$ (80:20), (B) -700 mV mit $N_2:CO_2$, (C) -800 mV mit CO_2 , (D) -900 mV mit CO_2 , (E) -700 mV mit CO_2 bis zur 70. Stunde und ab 70 h mit $N_2:CO_2$

5.3.3 Methan- und Wasserstoffkonzentrationen

Neben der Beschreibung der prozessrelevanten Daten in den vorherigen Abschnitten, ist die Methan- und Wasserstoffproduktion sowie die Zellzahl entscheidend für die Beurteilung der Effektivität des Systems. Für die Untersuchungen in den großen Reaktoren wurde *Mc. maripaludis* verwendet, da diese in den kleinen H-Zell-Reaktoren eine der höchsten Coulombsche Effizienzen und die höchste Methanausbeute erzielt hatte. Die Kultivierung in der großen H-Zelle verlief ähnlich zu der Kultivierung in den kleinen Reaktoren. Der Verlauf der Methan- und Wasserstoffproduktion ist in der Abbildung 22 dargestellt.

Vor dem Animpfen wurde zunächst das Medium bei einem Potential von -700 mV reduziert. Innerhalb dieses Spannungsbereiches stieg die Wasserstoffkonzentration aufgrund der elektrolytischen Wasserspaltung leicht an [174]. Anschließend erfolgte der gleiche Versuchsverlauf wie in den kleinen Reaktoren. Nach dem Reduzieren der großen H-Zelle

erfolgte das Animpfen der Kultur und die Kultivierung mit dem ersten Potential, nach einer Woche folgten die Versuchsabschnitte mit den weiteren Potentialen.

Bei -300 mV konnte keine Methan- und Wasserstoffproduktion festgestellt werden, ähnlich zu den Versuchen in den kleinen Reaktoren. Bei einem Potential von -700 mV konnte ab dem ersten Messpunkt in beiden großen H-Zellen eine Wasserstoffbildung gemessen werden sowie die Produktion von Methan. Über den Zeitraum von 168 h haben sich die methanogenen Mikroorganismen im Medium verdoppelt, siehe Tabelle 26. Die steigende methanogene Population führte zu einer steigenden Methanproduktion. Nach 144 h bei -700 mV konnte eine höhere Methanproduktion als der verbleibende Wasserstoff gemessen werden. Mit der großen H-Zelle konnte gegen Ende der Kultivierung bei einem Potential von -700 mV mit N₂:CO₂ eine Methanproduktion von 186 mmol pro m² Elektrodenoberfläche mit einer durchschnittlichen Methanproduktionsrate von 43 mmol/(m² d) erreicht werden. Die durchschnittliche Methanproduktionsrate in den kleinen H-Zell-Reaktoren lag für *Mc. maripaludis* mit 60 mmol/(m² d) in einem ähnlichen Bereich. In beiden Reaktortypen konnte keine wesentliche Menge an nicht umgesetzten Wasserstoff gemessen werden. Es wurden zwar in den großen H-Zellen eine ca. dreifach höhere Methankonzentration als in den kleinen H-Zellen innerhalb der 168 h bei -700 mV erreicht, doch ist diese erhöhte Methanproduktion auf die größeren Elektrodenflächen zurückzuführen.

Für das angelegte Potential von -800 mV wurde das Fütterungsgas von N₂:CO₂ (80:20) auf CO₂ zur Stabilisierung des pH-Wertes umgestellt, siehe Abschnitt 5.3.1. Zusätzlich verhinderte diese Maßnahme eine Substratlimitierung durch fehlendes CO₂. Zu Beginn der Kultivierung mit -800 mV konnte eine lag-Phase ähnlich wie bei Mayer *et al.* 2019 beobachtet werden [55]. Nach 72 h bei einem Potential von -800 mV erfolgte eine exponentielle Methanproduktion in den beiden großen H-Zellen. Jedoch konnten zwischen den beiden Reaktoren ein signifikanter Unterschied in der Methanproduktionsrate beobachtet werden. Bei der späteren Betrachtung der Kathodenoberfläche, siehe Abbildung 24 Seite 93, konnte auf der Elektrode vom Reaktor 1 ein geringerer Bewuchs mit Methanogenen festgestellt werden als wie beim Reaktor 2. Dieser unterschiedliche Bewuchs kann für die stark abweichende Umsetzung zu Methan verantwortlich sein. Die Gründe für den ungleich stark ausgeprägten Biofilm können vielseitig sein, z. B. leichte Unterschiede in der Temperatur, der pH-Werte sowie durch die Scherkräfte, die beim Begasen mit dem jeweiligen Fütterungsgas entstehen.

Die höchste Methankonzentration wurde in Reaktor 2 mit 1.850 mmol/m² nach 120 h bei einem Potential von -800 mV nachgewiesen. Mit einer maximalen Methanproduktionsrate von 940 mmol/(m² d) nach 96 h. In Reaktor 1 wurde eine Methankonzentration von 771 mmol/m²

nach 120 h bei -800 mV erreicht mit einer maximalen Produktionsrate von 330 mmol/(m² d) nach 96 h. Jedoch fielen die Methanproduktionen stark nach dem Erreichen des jeweiligen Maximums ab. Zum Schluss der Kultivierung bei -800 mV konnte im Reaktor 2 eine Methankonzentration von 1.280 mmol/m² und im Reaktor 1 596 mmol/m² nach 168 h gemessen werden. Der Gehalt an elektrolytisch gebildeten Wasserstoff stieg bei einem Potential von -800 mV über die gesamte Zeit hinweg exponentiell an. Bis zum Ende des Versuchszeitraumes konnte eine Wasserstoffkonzentration von 625 mmol/m² im Reaktor 1 und 960 mmol/m² im Reaktor 2 gemessen werden.

Bei einem Potential von -900 mV konnte keine signifikante Methanproduktion mehr nachgewiesen werden. Die Menge an nicht umgesetzten Wasserstoff von 1.440 mmol/m² wurde im Reaktor 1 und von 1.570 mmol/m² im Reaktor 2 nachgewiesen. Anschließend wurde nochmals ein Potential von -700 mV angelegt, um eine erneute Methanproduktion zu ermöglichen, zunächst mit CO₂ und anschließend mit N₂:CO₂ als Gasphase. Diese Maßnahmen erbrachten nicht die gewünschte Wirkung. Es konnte keine Methanproduktion mehr erreicht werden. Der Gehalt an Wasserstoff betrug bei der Fermentation mit reinem CO₂ 215 mmol/m² in Reaktor 1 und 243 mmol/m² in Reaktor 2. Bei der Fermentation mit N₂:CO₂ konnte eine Restmenge an Wasserstoff von 163 mmol/m² in Reaktor 1 und 167 mmol/m² in Reaktor 2 gemessen werden.

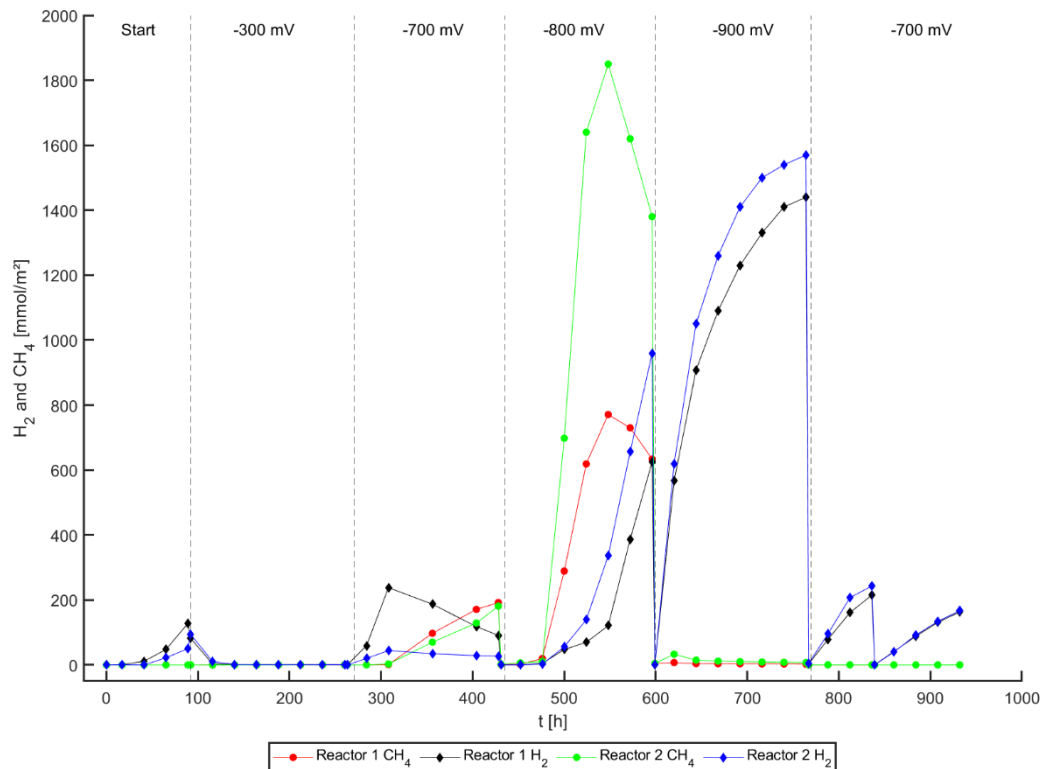


Abbildung 22 Methan- und Wasserstoffgehalte in den großen H-Zellen bei unterschiedlichen Potentialen. Bei einem Potential von -800 mV wurde auf CO_2 umgestellt. Bei der zweiten Kultivierung mit -700 mV wurde zunächst mit CO_2 kultiviert und anschließend zurück auf $\text{N}_2:\text{CO}_2$ umgestellt

5.3.4 Zellzahlen

Neben der Bestimmung der jeweiligen Methan- und Wasserstoffgehalte wurde ebenfalls die Zellzahl in den jeweiligen Potentialbereichen untersucht. Bei den Potentialen von -300 mV , -900 mV und bei der zweiten Kultivierung mit einem Potential von -700 mV konnten keine quantitativen Aussagen zu denen im Medium vorhandenen Zellen getroffen werden. Dagegen war eine quantitative Erfassung der planktonischen Zellen bei der ersten Kultivierung mit -700 mV möglich. Es konnte eine Verdopplung der Zellzahl im Vergleich zum Start gemessen werden. Bei einem Potential von -800 mV starb anscheinend ein großer Teil der Kultur ab, zu sehen daran, dass hier die Zellzahl unter die Startkonzentration gefallen ist. Dieser starke Rückgang ist mit großer Wahrscheinlichkeit ebenfalls der Grund für die sinkende Methanproduktion bei diesem Potential. Die Zellzahlen pro mL sind in der Tabelle 26 aufgelistet.

Tabelle 26 Zellzahl pro mL in der großen H-Zelle bei verschiedenen Potentialen. n.d. = nicht detektierbar = $<10^5$ Zellen pro mL. Die Zellzahlen wurden jeweils nach dem Ende der Fermentation mit dem jeweiligen Potential bestimmt.

Start	-300 mV N ₂ :CO ₂	-700 mV N ₂ :CO ₂	-800 mV CO ₂	-900 mV CO ₂	-700 mV CO ₂ und N ₂ :CO ₂
$1,4 \times 10^7 \pm 2,0 \times 10^5$	n.d.	$2,8 \times 10^7 \pm 5,0 \times 10^5$	$1,1 \times 10^7 \pm 2,3 \times 10^6$	n.d.	n.d.

Das Potential von -700 mV erwies sich unter den gegebenen Versuchsbedingungen als das am besten geeignete Potential für die Methanogene. In der Literatur wurden ebenfalls die meisten Experimente bei einem Potential von -700 mV durchgeführt [35,55,69,166].

Bei einem Potential von -800 mV konnte kurzzeitig eine sehr hohe Methanproduktion gemessen werden, diese fiel jedoch innerhalb von 2 Tagen sehr stark ab. Eine solche nur kurzzeitige hohe Methanbildung wurde ebenfalls bei Zhou *et al.* 2020 beobachtet [48]. Parallel zur nach kurzer Versuchsdauer sinkenden Methanbildung verringerte sich die Zellzahl ebenfalls bei -800 mV. Ein Grund für das Absterben der Methanogene sowie der damit verbundene Rückgang der Methanproduktion könnte die hohe Stromdichte von -2000 mA/m² gewesen sein [175,176]. Eine solches Absterben der Zellen bei ähnlicher Stromdichte konnten Ding *et al.* 2016 in einer H-Zelle unter einer Verwendung einer Mischkultur beobachten. Bei der Erhöhung der Zellspannung konnte ein Anstieg der Konzentrationen von der Lactatdehydrogenase (LDH) und Adenosintriphosphat (ATP) detektiert werden. LDH und ATP sind Zellbestandteile, welche sich normalerweise in der Zelle befinden. Durch die hohe Spannung erfolgte eine Zellschädigung, die die Freisetzung von LDH und ATP erklärt [176]. In einer weiteren Publikation mit einem 20 L Ein-Zell-Reaktor und einer Mischkultur wurde ein ähnliches Ergebnis erhalten. Nach einer kurzzeitigen Erhöhung der Stromstärke konnten kurzzeitig höhere Methanproduktionsraten erzielt werden, welche jedoch anschließend rapide absanken. Nach einem Wechsel auf die Ausgangsstromstärke erholte sich die Kultur und erzielte nach einer kurzen Lag-Phase wieder die gleichen Methanproduktionsraten wie vor der Stromstärkenerhöhung. Der Abfall der Methanproduktion und die kurze Lag-Phase wurde laut der Autoren auf die Bildung von Sauerstoff an der Anode zurückgeführt, das in den Reaktionsraum diffundiert ist. Die steigende Sauerstoffkonzentration im Kathodenraum überschritt den Toleranzbereich der Methanogenen, welche daraufhin abstarben. Nach dem Wechsel auf die Ausgangsstromstärke wurde der Sauerstoff von den Begleitbakterien der Mischkultur verstoffwechselt. Durch den nun nur noch geringen Sauerstoffgehalt konnten die Methanogenen anschließend wieder anwachsen [177].

Anhand der genannten Gründe und der Begleitmessung von Sauerstoff konnte ein kurzzeitiger Anstieg auf über 10 % über 24 h nachgewiesen werden. Diese toxische Konzentration an Sauerstoff führte zu einem Absterben von der verwendeten *Mc. maripaludis* Kultur [178].

5.3.5 Bilanzierung der chronoamperometrischen Messungen

Die CE wurde für -700 mV mit N₂:CO₂ und -800 mV mit CO₂ bestimmt, da ab einem Potential von -900 mV keine signifikante Methanproduktion mehr stattfand. In der Abbildung 23 (A) ist die CE bei einem Potential von -700 mV mit N₂:CO₂ dargestellt. Zu erkennen ist ein gradueller Anstieg der CE mit einem Höchstwert bei 144 h mit 165 % ± 72 % (nähere Erläuterung siehe unten). Am darauffolgenden Tag ist die Effizienz auf einen Wert von 74 % ± 33 % abgefallen. Zum Zeitpunkt bei 120 h konnten aufgrund eines technischen Defekts keine GC-Daten erfasst werden.

Es hat sich insgesamt gezeigt, dass es innerhalb der großen H-Zelle möglich ist, höhere Methanausbeuten und Effizienzen zu erhalten als in den kleinen Reaktoren. Die Erhöhung der Effizienz und der Methanausbeute kann durch die Vergrößerung der Elektrodenoberfläche, der größeren Membranfläche sowie das größere Reaktionsvolumen erklärt werden.

In der Abbildung 23 (B) ist die CE bei -800 mV dargestellt. Hier stieg die CE auf einen Wert von 263 % ± 59 % an (bei 96 h, nähere Erläuterung siehe unten). Anschließend fiel die CE, innerhalb von weiteren 72 h, auf unter 0 %, da ab diesem Zeitpunkt keine signifikante Methanproduktion mehr stattfand, welches mit dem Absterben der Kultur einherging. Dieser starke Abfall konnte verschiedene Gründe gehabt haben. Zum einen könnte die Stromstärke für die Methanogenen zu hoch gewesen sein, welches eine Lyse der Zellwände ausgelöst haben könnte und somit zu einem Absterben der Zellen führte [175,176]. Zum anderen könnte die plötzlich stark erhöhte Wasserstoffkonzentration an der Elektrode die Methanogenese gehemmt haben, welches zum Absterben des verwendeten Stammes *Mc. maripaludis* bedingte [21,179]. Ein weiterer möglicher Grund könnte eine zu hohe Sauerstoffkonzentration im Medium gewesen sein. Sauerstoff wird auf der Anodenseite durch die Spaltung des Wassers bei der hier genutzten Spannung gebildet sowie Hydroxid-Ionen, Protonen und Elektronen [118]. Der Sauerstoff kann durch die Diffusion über die Membran in den Kathodenbereich gelangen und diese langsam „vergiften“ [99]. Dieses könnte zu einer weiteren Hemmung oder zum Absterben der Methanogenen geführt haben [177].

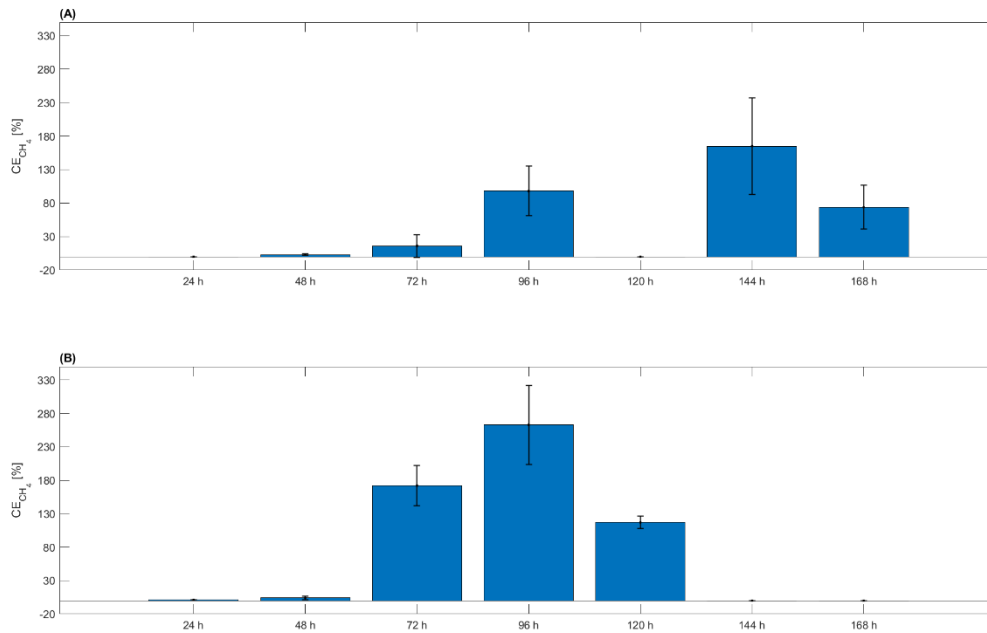


Abbildung 23 Coulombsche Effizienzen unter Verwendung von *Mc. maripaludis* bei zwei verschiedenen Potentialen (A) -700 mV und (B) -800 mV

In der großen H-Zelle wurden, insbesondere zu Beginn einer Versuchsreihe, CE über 100 % erreicht. CE über 100 % weisen darauf hin, dass mehr Energie im System vorhanden war, als elektrische Energie von außen hinzugefügt wurde [68]. Mögliche Erklärungsansätze könnten folgende Punkte sein: Die zusätzliche Energie kann dadurch zur Verfügung gestanden haben, dass frei geworden Zellbestandteile von lysierten Zellen von den noch lebenden Zellen aufgenommen worden sind. Diese zusätzlichen organischen Bestandteile konnten als alternative Elektronendonoren genutzt werden, unabhängig von dem angelegten Strom [180].

Neben der Aufnahme von lysierten Zellbestandteilen konnten ebenfalls andere Medienbestandteile als Elektronenquellen genutzt werden [68]. In dem verwendeten Medium wurden zum Reduzieren des Mediums unter anderen Cystein und Fe²⁺-Citrat hinzugefügt. Die Sulfhydrylgruppe des Cysteins kann dabei als ein alternative Elektronenquelle genutzt worden sein [68]. Das zweiwertige Eisen (Fe²⁺) konnte ebenfalls als zusätzliche Elektronenquelle dienen, da Methanogene dieses Spurenelement in deren Energiegewinnung, der eigentlichen Methanogenese benötigen [181]. Welche der möglichen Gründe nun ausschlaggebend für die mehr als 100 % betragenden Effizienzen war, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Es wird davon ausgegangen, dass eine Mischung aller genannten Gründe am wahrscheinlichsten ist.

5.3.6 Rasterelektronenmikroskopie der Kathoden

Nach Beendigung der Versuchsreihe zur Untersuchung des geeigneten Potentials in der großen H-Zelle wurden die Kathoden fixiert und mittels eines Rasterelektronenmikroskops untersucht. In der Abbildung 24 sind exemplarisch zwei Aufnahmen der Elektrodenoberflächen, bewachsen mit *Mc. maripaludis*, dargestellt. Auf beiden Elektroden sind die kokkoiden Strukturen des Organismus gut zu sehen. Auf der Elektrode von Reaktor 1, Abbildung 24 (A) sind weniger Methanogenen zu erkennen als im Vergleich zu Reaktor 2, Abbildung 24 (B). Die Morphologie der Methanogene zeigt Unterschiede zu den REM-Bildern in den kleinen H-Zellen auf, siehe Abbildung 18 (E) Abschnitt 5.2.7. Die immobilisierten Methanogene an den Kathoden der großen H-Zelle weisen starke Verformungen auf. Diese Verformung der Zellen deuteten darauf hin, dass für die Methanogenen keine optimalen Bedingungen mehr vorhanden waren. Diese morphologischen Veränderungen sind wahrscheinlich durch die ungünstigen Bedingungen bei den Potentialen von -800 mV und -900 mV zu erklären. Ein weiterer Grund für die Deformierung könnte die Adsorption von Mineralien des Mediums an der Elektrodenoberfläche sein, erkennbar an den kristallinen Ablagerungen. Dadurch könnten eventuell adsorbierte Spurenelemente den Mikroorganismen nicht mehr zur Verfügung stehen, was dazu führen kann, dass den Organismen essenzielle Mineralien fehlen. Ebenso kann die Adsorption an Mineralien an der Kathode die Konzentration dieser in Elektrodennähe stark erhöht haben, sodass eine zu hohe Salinität um die Elektrode herum zu einem Absterben der Methanogene geführt haben kann.

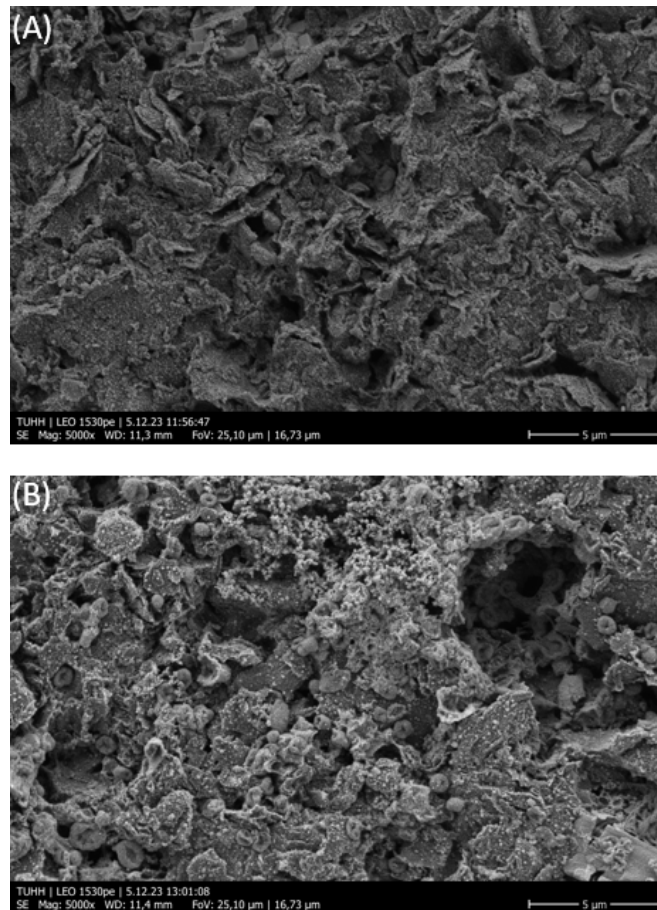


Abbildung 24 REM-Aufnahmen der Kathodenoberflächen nach der Elektrofermentation mit *Mc. maripaludis* in der großen H-Zelle. (A) Elektrodenoberfläche von Reaktor 1, (B) Elektrodenoberfläche von Reaktor 2

5.3.7 Fazit für Experimente in der großen H-Zelle

In der großen H-Zelle wurde die Methanproduktion vom *Mc. maripaludis* bei verschiedenen Potentialen untersucht, bei -300 mV, -700 mV, -800 mV und -900 mV. Die Versuche ergaben, dass bei einem Potential von -300 mV und -700 mV ein ähnliches Ergebnis erzielt werden konnte, wie in den kleinen H-Zell-Reaktoren.

Bei einem Potential von -800 mV konnte in Reaktor 2 kurzzeitig die Methanproduktion im Vergleich zu -700 mV um das 10-fache gesteigert werden, im Reaktor 1 um das 2,5-fache. Jedoch sank die Methanproduktion in beiden Reaktoren danach rapide ab und die Wasserstoffkonzentrationen stiegen proportional an, da dieser nicht mehr zu Methan verstoffwechselt werden konnte. Bei einem Potential von -900 mV konnte keine Methanproduktion mehr festgestellt werden, lediglich die Bildung von Wasserstoff. Bei der anschließenden Fermentation bei wiederholten -700 mV wurde ebenfalls keine erneute Methanproduktion mehr erreicht. Die Schädigung der Methanogenen hatte aller Wahrscheinlichkeit ein Zusammenspiel folgender Gründe: Ein zu hohes Potential, ein erhöhter

Wasserstoffpartialdruck, einer zu übermäßige Sauerstoffsättigung des Mediums oder einer zu hohen Salinität in Elektrodennähe.

In der großen H-Zelle kann im Vergleich zu -700 mV bei -800 mV eine kurzzeitige bis zu 10-fach höhere Methanproduktion erreicht werden.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die Versuche für eine Untersuchung des Lastenwechsels bei einem Potential von -700 mV durchgeführt. Bei diesem Potential konnten bisher die konstantesten Methanproduktionen erzielt werden.

5.4 Lastenwechsel in großen H-Zelle

Die Elektromethanogenese ist eine Option für die künftige Energiespeicherung von erneuerbaren Energien. Hierfür muss zunächst jedoch die Flexibilität dieser Technologie erforscht werden, da es bei Windkraft- oder Photovoltaikanlagen jeweils Tages- bzw. Jahreszeiten-abhängige Stromproduktionen gibt.

In dieser Arbeit wird die Annahme einer stark vereinfachten Photovoltaikanlage als Grundlage verwendet. Dabei wird für die Simulation des Tages ein Potential von -700 mV für 12 h angelegt und für die Simulation der Nacht ein Potential von $+200\text{ mV}$ (0 mV vs. Ag/AgCl). Bei dem zuletzt genannten Potential wird die Methanogenese elektrochemisch nicht bevorzugt.

Innerhalb dieses Tag-Nacht-Rhythmus wurde das Intervall der Probennahmen auf 3 h festgelegt, um die Dynamik der Methan- und Wasserstoffproduktion von *Mc. maripaludis* gut zeitaufgelöst untersuchen zu können. Vor dem Beginn des Tag-Nacht-Rhythmus wurde zunächst *Mc. maripaludis* bei -700 mV für 4 Tage vorkultiviert.

Die stark vereinfachte Annahme einer Photovoltaikanlage ist notwendig, um das Prinzip bzw. die Effizienz der indirekten Elektromethanogenese bei intermittierenden Spannungen zu prüfen. Die Ergebnisse können als Grundlage für die Erhöhung des technologischen Reifegrades dienen.

Wie in den vorherigen Kapiteln spielte der pH-Wert eine entscheidende Rolle für eine optimale Elektrofermentation. Basierend auf den bereits erzielten Ergebnissen wurde von Anfang an ein Puffersystem gewählt, welches die Anforderung von *Mc. maripaludis* (z.B. dem pH-Optimum zwischen 5,5 -7,0) entspricht [51,92]. Für die Untersuchung des Lastenwechsels wurde zunächst der pH-Wert manuell auf 7,0 im Kathodenraum eingestellt. Anschließend wurde während des gesamten Versuchsablaufes reines CO_2 hinzugefügt. Durch die konstante Produktion von OH^- an der Kathode und der Zugabe von reinem CO_2 wurde während des Experimentes ein konstanter pH-Wert von 6,9 bzw. 6,7 in den jeweiligen Reaktoren gehalten. Auf der Anodenseite fiel der pH von 7,4 auf durchschnittlich 6,4 ab. Dieser Abfall ist durch die Spaltung von Wasser in Sauerstoff und Protonen zu erklären. Im Tagmodus wurden dementsprechend immer Protonen gebildet. Im Nachtmodus konnten diese auf die Kathodenseite diffundieren und aufgenommen werden. Aus diesem Grund entsteht ein Sägezahnmuster auf der Anodenseite während des Tag-Nacht-Rhythmus, siehe Abbildung 25.

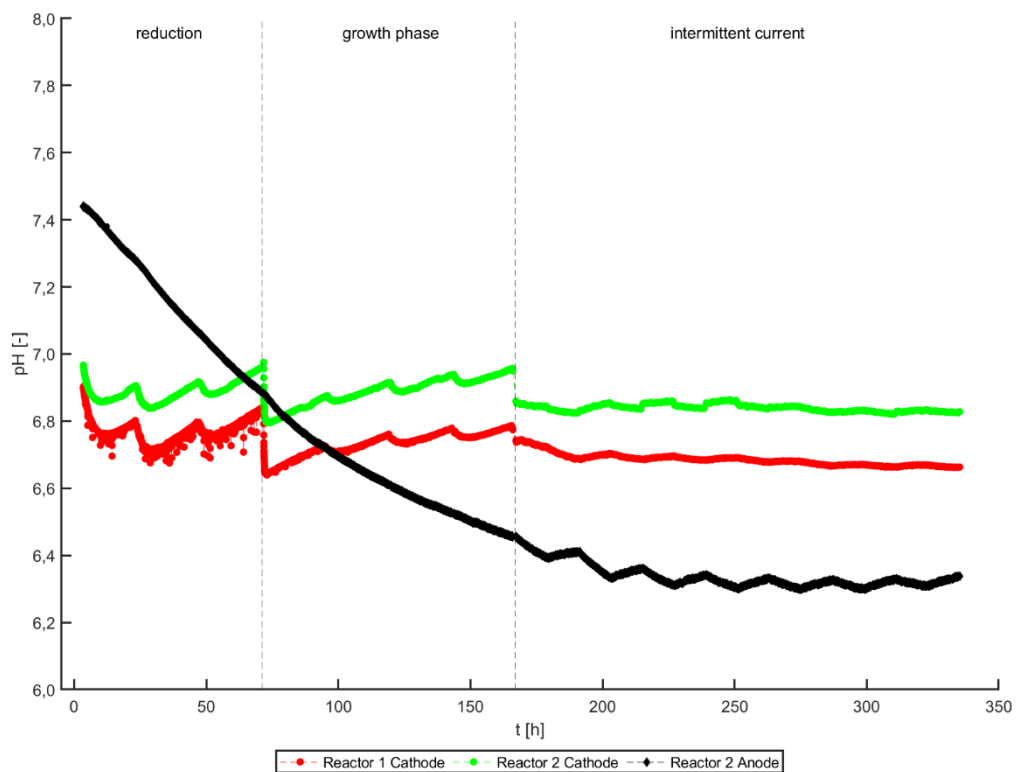


Abbildung 25 Gesamter pH-Verlauf bei der Untersuchung des Lastenwechsels (pH-Messung auf der Anodenseite, Reaktor 1)

Bei der Betrachtung des Druckes ist ein ähnliches Verhalten im Vergleich zum Lastenwechsel in den jeweiligen Phasen zu erkennen, siehe Abbildung 26. Bei der Phase zur Reduzierung des Mediums und der Anwachsphase wurde jeweils alle 24 h Stunden CO_2 in das Medium geleitet. Das CO_2 löste sich im Reaktor und wurde von *Mc. maripaludis* verstoffwechselt. Daraus ergab sich ein gleichmäßiger Druckabfall von 550 mbar auf ca. 250 mbar in der Anwachsphase. Bei der Umstellung auf den Tag-Nacht-Rhythmus konnte ein ähnliches Verhalten beobachtet werden, wobei hier der Druckabfall, aufgrund des 3-stündigen Probeintervalls und der Nachführung von CO_2 nicht so stark war. Dabei konnte ein durchschnittlicher Druckabfall innerhalb von 3 h von ca. 50 mbar gemessen werden. Bei der Betrachtung des gesamten Druckverlaufes im Tag-Nacht-Rhythmus kann man eine leicht oszillierende Kurve erkennen. Diese ist durch den Umgebungsdruck zu begründen, der sich je nach Wetterlage sowie Tag- und Nachtzeit änderte.

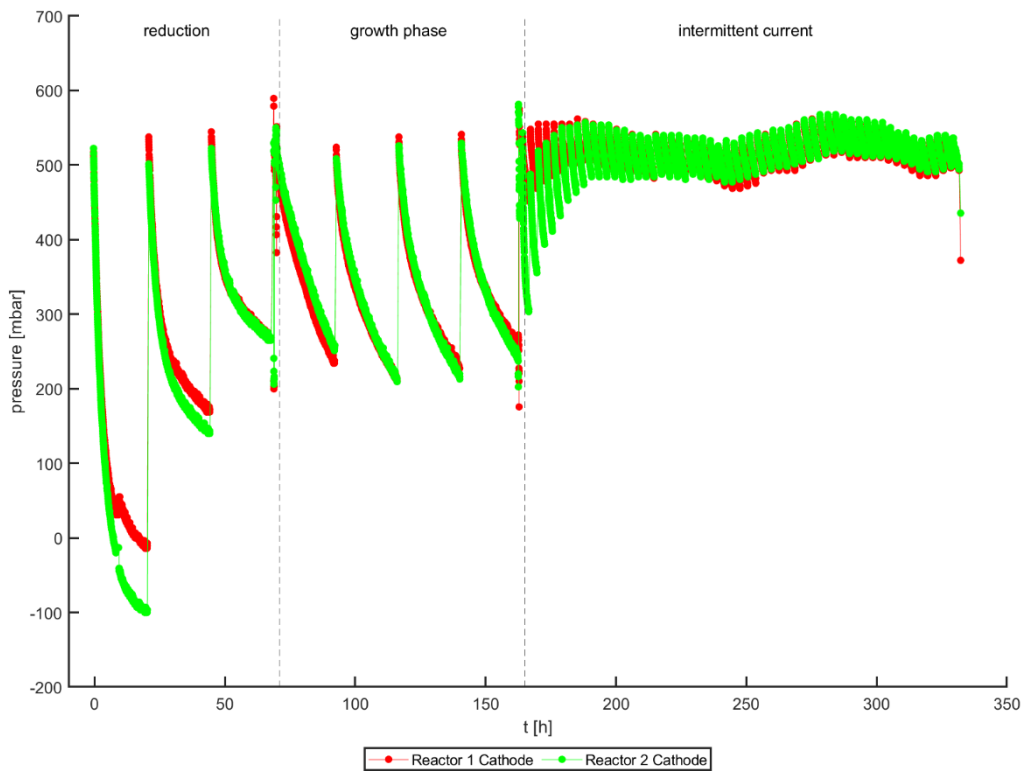


Abbildung 26 Druckverlaufskurve bei der Untersuchung des Lastenwechsels

5.4.1 Chronoamperometrische Messungen

Für die chronoamperometrische Untersuchung des Tag-Nacht-Rhythmus nach dem vereinfachten Verlauf einer Photovoltaikanlage wurde für die Nacht ein Potential von +200 mV (blaue Kurve) und -700 mV (grüne Kurve) für den Tag gewählt, siehe Abbildung 27. Durch diese Einstellungen sollte geklärt werden, ob *Mc. maripaludis* für den industriellen Einsatz mit fluktuierenden Spannungen bzw. Stromzufuhr geeignet ist.

Zu Beginn der simulierten Nacht konnte bei jedem Abschnitt ein Abfall der Stromdichte auf 0 mA/m² beobachtet werden. Im Nachtmodus konnte keine wesentliche Änderung der Stromdichte erfasst werden. Im Tagmodus, bei -700 mV, konnte am ersten Tag eine Stromdichtenveränderung von -1000 mA/m² auf -750 mA/m² beobachten werden. Am zweiten Tag wurde eine durchschnittliche Stromdichte von -900 mA/m² gemessen. In den darauffolgenden Tagen konnte durchschnittlich eine Stromdichte von -400 mA/m² erreicht werden. Im Vergleich zu den vorherigen Versuchen in der kleinen H-Zelle und dem Langzeitversuch in der großen H-Zelle wurde ein ähnliches Verhalten in Bezug auf die chronoamperometrische Messung beobachtet.

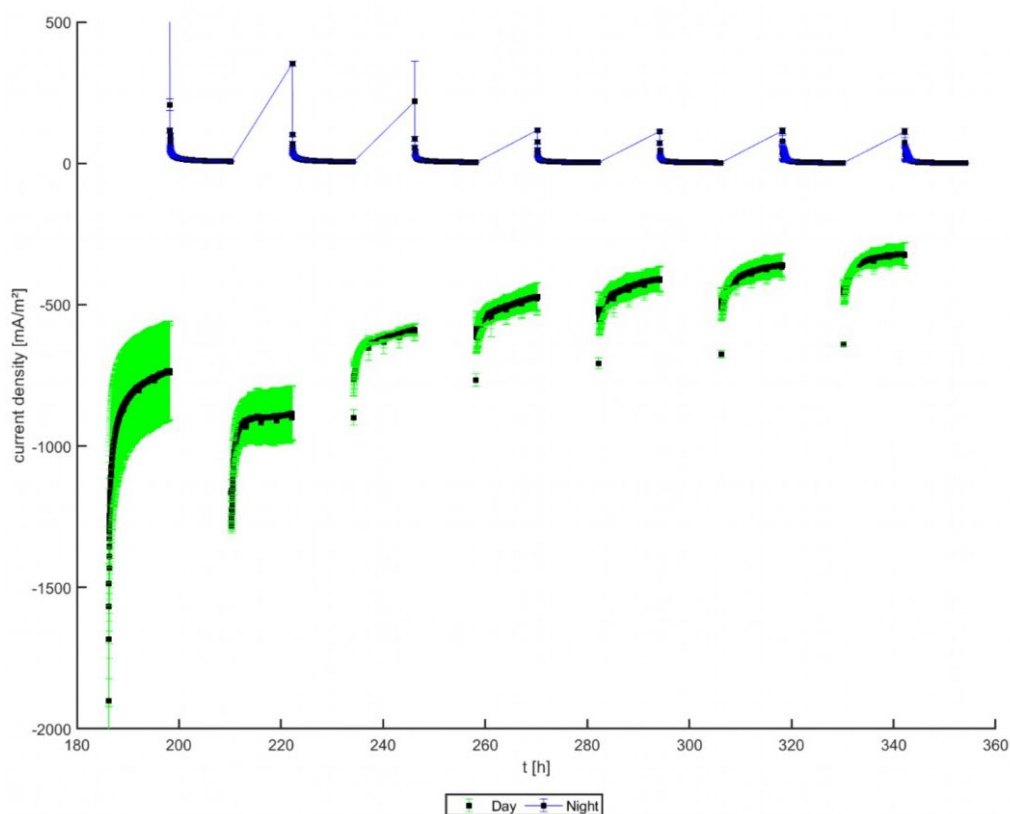


Abbildung 27 Chronoamperometrische Messung beim Lastenwechsel. Der Tag wurde mit einem Potential von -700 mV (grün) simuliert, die Nacht bei $+200\text{ mV}$ (blau)

5.4.2 Methan- und Wasserstoffkonzentrationen und Zellzahlen

Für die Beschreibung der Methan- und Wasserstoffproduktion innerhalb des Tag-Nacht-Rhythmus wurde alle 3 h die $\Delta_{\text{Konzentration}}$ dargestellt, siehe Abbildung 28. Bei diesen Konzentrationen handelt es sich um die Steigerung bzw. Abnahme der Methan- bzw. Wasserstoffkonzentration innerhalb des Probenzeitraumes:

$$\Delta_{\text{Konzentration}} = t_1 - t_0 \quad (12)$$

t_1 = aktuelle Methan – bzw. Wasserstoffkonzentration

t_0 = letzte Methan – bzw. Wasserstoffkonzentration

Bei der Betrachtung des Reaktor 1 konnte am ersten Tag eine Methanproduktionsrate von $2,1\text{ mmol}/(\text{m}^2\text{ h})$ (Tag 1) gemessen werden. In den drauffolgenden Tagen wurden Methanproduktionsraten $2,0\text{ mmol}/(\text{m}^2\text{ h})$ (Tag 2) und $0,6\text{ mmol}/(\text{m}^2\text{ h})$ (Tag 3) gemessen. Eine nochmalige leichte Erhöhung der Rate von $0,7\text{ mmol}/(\text{m}^2\text{ h})$ konnte in den weiteren

Tagen (Tag 4 - Tag 7) bestimmt werden. Im Reaktor 1 wurde Wasserstoff als Elektronendonator nur in geringen Mengen von durchschnittlich $0,1 \text{ mmol}/(\text{m}^2 \text{ h})$ nachgewiesen. Am zweiten Tag des Tag-Nacht-Rhythmus wurde ein Maximalwert von $0,3 \text{ mmol}/(\text{m}^2 \text{ h})$ an nicht umgesetzten Wasserstoff erreicht.

Der Reaktor 2 erzielte ähnliche Methanproduktionsraten wie Reaktor 1. Jedoch wurde in Reaktor 2 insgesamt eine höhere Methanproduktion gemessen. Am ersten Tag wurde die maximale Methanproduktion von $2,7 \text{ mmol}/(\text{m}^2 \text{ h})$ erreicht, welche sich in den folgenden Tagen (Tag 2 – Tag 3) von $2,5 \text{ mmol}/(\text{m}^2 \text{ h})$ auf $0,6 \text{ mmol}/(\text{m}^2 \text{ h})$ verringerte. Ab dem vierten Tag konnte keine signifikante Methanbildung mehr nachgewiesen werden. Bei der Betrachtung der Wasserstoffbildung wurde am ersten Tag mit großer Wahrscheinlichkeit die gesamte Menge an gebildeten Wasserstoff in Methan umgesetzt, da kein Wasserstoff detektiert wurde. Am zweiten Tag konnte eine Wasserstoffkonzentration von maximal $0,9 \text{ mmol}/(\text{m}^2 \text{ h})$ gemessen, die an Tag 3 auf einen Maximalwert von $0,3 \text{ mmol}/(\text{m}^2 \text{ h})$ sank. Ab dem vierten Tag stieg die Wasserstoffkonzentration auf $2,4 \text{ mmol}/(\text{m}^2 \text{ h})$ an und fiel nach 7 Tagen des Experimentes auf $1,3 \text{ mmol}/(\text{m}^2 \text{ h})$ wieder ab.

Innerhalb der ersten drei Tage ist der Effekt des Tag-Nacht-Rhythmus klar zu erkennen (siehe Abbildung 28). Während des Tages wurde aktiv von *Mc. maripaludis* Methan produziert, in der Nacht fällt die Methankonzentration ab, da kein Wasserstoff mehr durch die Elektrolyse des Wassers gebildet wurde. Am darauffolgenden Tag steigen die Wasserstoffkonzentration sowie die Methanproduktion wieder an. Im Vergleich zum ersten Tag konnte hier eine höhere Wasserstoffkonzentration gebildet werden, da nicht der ganze Wasserstoff durch die Methanogenen umgesetzt wurde. Der Grund für die Hemmung der Methanogenese konnte abschließend nicht eindeutig geklärt werden. Am dritten Tag fiel die Methanproduktion in beiden Reaktoren rapide ab und betrug nur noch etwa $1/4$ der Methanbildung von Tag 1. In den folgenden Tagen konnte in Reaktor 1 jeweils eine Methanproduktionsrate von ca. $0,7 \text{ mmol}/(\text{m}^2 \text{ h})$ gemessen werden. In diesem Reaktor schien sich ein Gleichgewicht zwischen der Methan- und der Wasserstoffproduktion eingeschaltet zu haben. In Reaktor 2 konnte keine Methanproduktion ab dem dritten Versuchstag mehr nachgewiesen werden. Es war anzunehmen, dass in diesem Reaktor die Methanogenen stark gehemmt oder abgestorben sind, da der Tag-Nacht-Rhythmus klar an der Wasserstoffbildung zu sehen ist.

Deutzmann *et al.* 2023 untersuchte ebenfalls den simulierten Tag-Nacht-Rhythmus einer Photovoltaikanlage in Bezug auf die Wasserstoffkonzentration eines elektromethanogen Systems und die Methanproduktion von *Mc. maripaludis*. Jedoch können die erzielten Ergebnisse nicht direkt mit denen dieser Arbeit verglichen werden, da das System von

Deutzmann kontinuierlich mit frischem Medium durchspült worden ist. Durch den konstanten Medienwechsel konnten Medienbestandteile, welche über die Zeit verbraucht, worden sind, ersetzt bzw. neu hinzugefügt werden. Somit konnte z. B. reduziertes Fe^{3+} mit Fe^{2+} ausgetauscht werden, welches als Stoffwechselintermediat in der Methanogenese benötigt wird [182]. Des Weiteren erfolgte durch den kontinuierlichen Austausch des Mediums ein anscheinend konstanteres Wachstum der Kultur, welches wiederum sich in einer konstanten Methanproduktion widerspiegelt [183]. Diese kostenintensive Maßnahme, die bei einem Up-Scaling der Elektromethanogenese nahezu unmöglich ist, trug zu den gleichbleibenden Methanproduktionsraten bei [92].

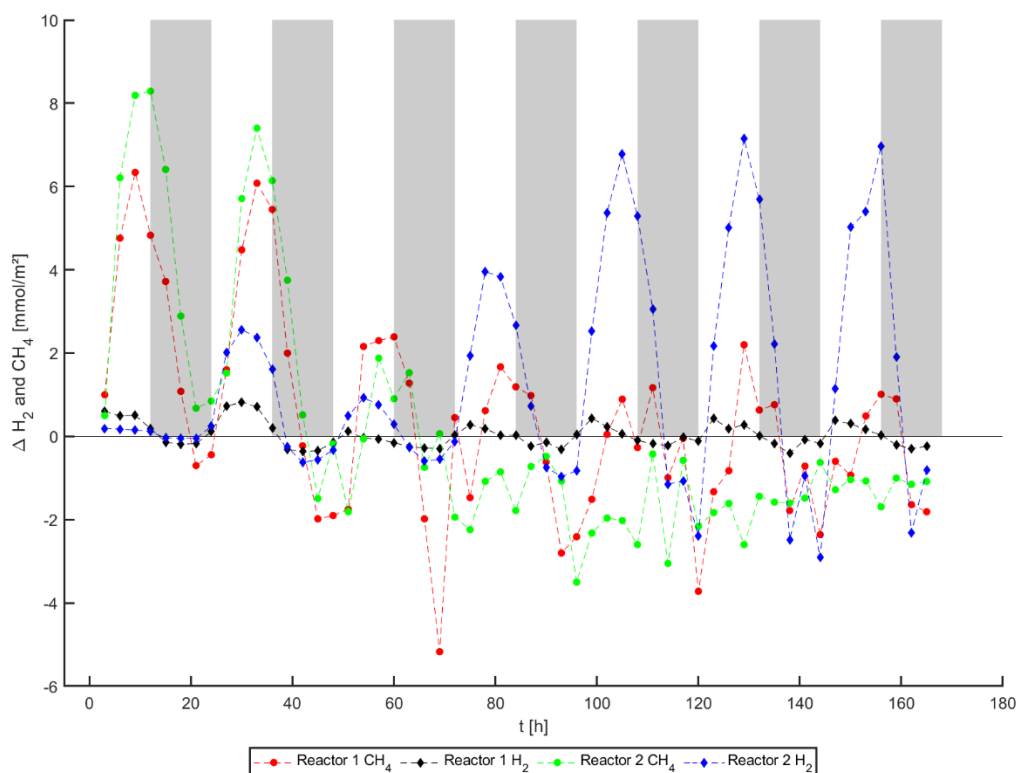


Abbildung 28 Darstellung der Δ Konzentrationen (t_0-t_1) von Methan und Wasserstoff. Das Messintervall betrug 3 h. Die grau hinterlegten Bereiche zeigen die Abschnitte mit einem Potential von +200 mV (Nachtmodus), die hellen Bereiche diejenigen mit einem Potential von -700 mV (Tagmodus)

In der Abbildung 29 ist die kumulative Methanproduktion und die Wasserstoffkonzentration des Tag-Nacht-Rhythmus dargestellt. Diese Visualisierung wurde genutzt, um die Langzeitstabilität des Experiments besser abschätzen zu können.

In beiden Reaktoren zeigte sich jeweils ein Anstieg der Methanproduktion und der Wasserstoffkonzentration innerhalb der ersten drei Tage. Im Reaktor 1 wurde eine maximale Methanproduktion von 15 mmol/(m² h) innerhalb von 3 Tagen erreicht. Die Wasserstoffkonzentration blieb konstant mit einem durchschnittlichen Wert von

0,5 mmol/(m² h), was eine vollständige Umsetzung des zusätzlich gebildeten Wasserstoffs bedeutete. In Reaktor 2 wurde eine maximale Methankonzentration von 22,3 mmol/(m² h) nach 42 h erreicht. Jedoch fiel danach die Methanproduktion bis zum Ende des Versuchszeitraumes kontinuierlich ab. Ab dem sechsten Tag wurde eine höhere Wasserstoff- als Methankonzentration in Reaktor 2 gemessen. Die höchste Wasserstoffkonzentration und damit die geringste Umsetzung zu Methan erreichte ein Maximum von 24,1 mmol/(m² h) an Tag 7 (160 h).

In beiden Reaktoren ist ebenfalls zu erkennen, dass die Methanbildung über die Zeit nach einem anfänglichen Hoch sinkt. Dieser Abfall kann durch das alternde Medium erklärt werden. Durch die Elektrolyse können verschiedene Spurenelemente aus dem Medium an der Elektrode adsorbiert oder reduziert werden. Dadurch nimmt die Menge der bioverfügbaren Spurenelemente im flüssigen Medium ab und stehen dann den Methanogenen nicht mehr zur Verfügung.

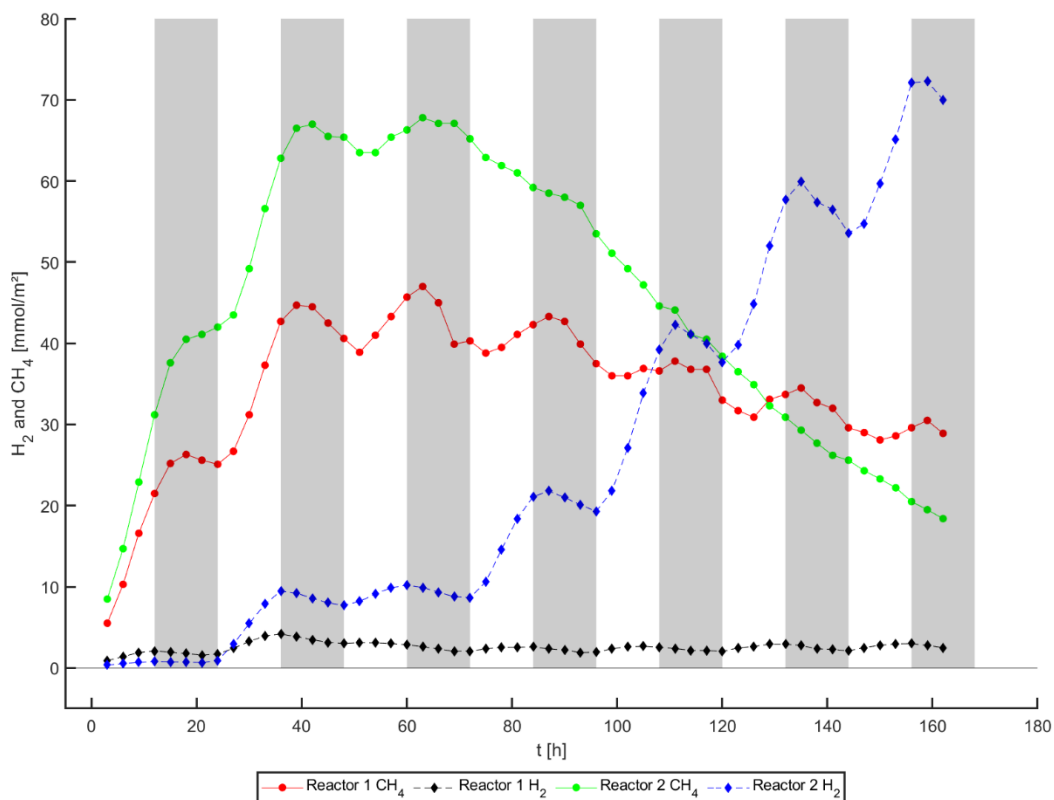


Abbildung 29 Darstellung der kumulierten Methan- und Wasserstoffkonzentrationen. Die grau hinterlegten Bereiche symbolisieren ein Potential von +200 mV (Nachtmodus), die hellen Bereiche ein Potential von -700 mV (Tagmodus)

Innerhalb des oben beschriebenen Versuches wurde zusätzlich insgesamt dreimal die Zellzahl bestimmt: Zum Start, nach der Anwachsphase (4 Tage bei -700 mV) und nach dem gesamten Tag-Nacht-Rhythmus. Die Reaktoren wurden mit einer Zellzahl von $8,9 \times 10^6$ Zellen/mL

angepflegt. Innerhalb der Anwachsphase konnte sich die Zellzahl verdreifachen. Jedoch sank die Zellzahl nach dem Tag-Nacht-Rhythmus wieder auf eine ähnliche Zellzahl wie zum Zeitpunkt des Beimpfens der Reaktoren ab. Diese Daten legen ebenfalls nahe, dass sich in den Reaktoren hemmende oder sogar toxische Bedingungen für die Organismen gebildet haben müssen, siehe Tabelle 27.

*Tabelle 27 Zellzahl pro mL während der Untersuchung des Tag-Nacht-Rhythmus mit *Mc. maripaludis*. Die Zellzahlen wurden jeweils nach den jeweiligen Prozessabschnitten bestimmt.*

Start	Anwachsen	Tag-Nacht-Rhythmus
$8,9 \times 10^6 \pm 2,2 \times 10^6$	$2,8 \times 10^7 \pm 4,3 \times 10^6$	$8,8 \times 10^6 \pm 1,1 \times 10^6$

5.4.3 Bilanzierung der chronoamperometrischen Messungen

Für die Bilanzierung des Versuches werden zwei verschiedene Phasen des gesamten Experiments betrachtet, die Anwachsphase und die Tag-Nacht-Phase. In der Anwachsphase wurden die Reaktoren beimpft und für 4 Tage bei einem Potential von -700 mV kultiviert. Anschließend wurde in der zweiten Phase der oben beschriebene Tag-Nacht-Rhythmus gestartet. Die Bilanzierung der Anwachsphase ist in Abbildung 30 (A) dargestellt. Innerhalb der ersten 72 h wurde eine CE von $119 \pm 7 \%$ errechnet und fiel am Folgetag (96 h) auf $100 \pm 39 \%$ ab, was auf ein Absterben der Kultur in einem Reaktor (Reaktor 1) hindeutet. CEs über 100 % weisen darauf hin, dass dem Reaktor mehr Energie zur Verfügung steht als durch das Potentiostat geliefert wird. Die zusätzliche Energie kann von lysierten Zellen, Cystein oder Fe^{2+} -Ionen stammen, siehe Abschnitt 5.3.5.

Im Anschluss an die Anwachsphase erfolgte die Umstellung auf den Tag-Nacht-Rhythmus, siehe Abbildung 30 (B-D). In diesen Abbildungen sind die ersten drei Tage des Tag-Nacht-Phase dargestellt. Ab dem vierten Tag konnte keine Methanproduktion mehr festgestellt und somit auch keine CE berechnet werden. Nach den ersten 3 h des ersten Tages (Abbildung 30 B) wurde eine CE von $40 \pm 11 \%$ gemessen, welcher nach 6 h auf eine CE von $7 \pm 3 \%$ abfiel. Anschließend stieg die CE jedoch innerhalb der nächsten Stunden im ersten Tag-Modus auf $70 \pm 3 \%$. Die zunächst hohe Anfangs-CE von 40 % nach 3 h kann, durch den in der Anwachsphase gebildeten Wasserstoff erklärt werden. Dieser konnte aufgrund baulicher Gegebenheiten in dem vorherigen Spülvorgang nicht komplett aus dem Medium und dem Kopfraum entfernt werden. Dadurch stand den Methanogenen noch Rest-Wasserstoff zur

Verfügung. Am zweiten Tag des Tag-Nacht-Rhythmus konnte ein Anstieg der CE von anfänglichen $1 \pm 5\%$ auf $52 \pm 1\%$ bestimmt werden (siehe Abbildung 30 C). Der verminderte Anstieg im Vergleich zum ersten Tag zeigt, dass über die Nacht Methanogene teilweise abgestorben oder in eine Art Ruhemodus übergegangen sind. Innerhalb des zweiten Tages steigerte sich die Aktivität der Methanogenen demnach nur knapp über 50%. Diese abnehmende Tendenz der Aktivität und damit der Methanproduktion konnte auch am dritten Tag des Tag-Nacht-Rhythmus beobachtet werden (siehe Abbildung 30 D). Am dritten Tag wurde nach 12 h nur noch eine CE von $25 \pm 2\%$ erreicht. Die stetig geringer werdende Methanproduktion und die damit einhergehende kleiner werdende CE weist auf ein Absterben oder Hemmung der Kultur hin.

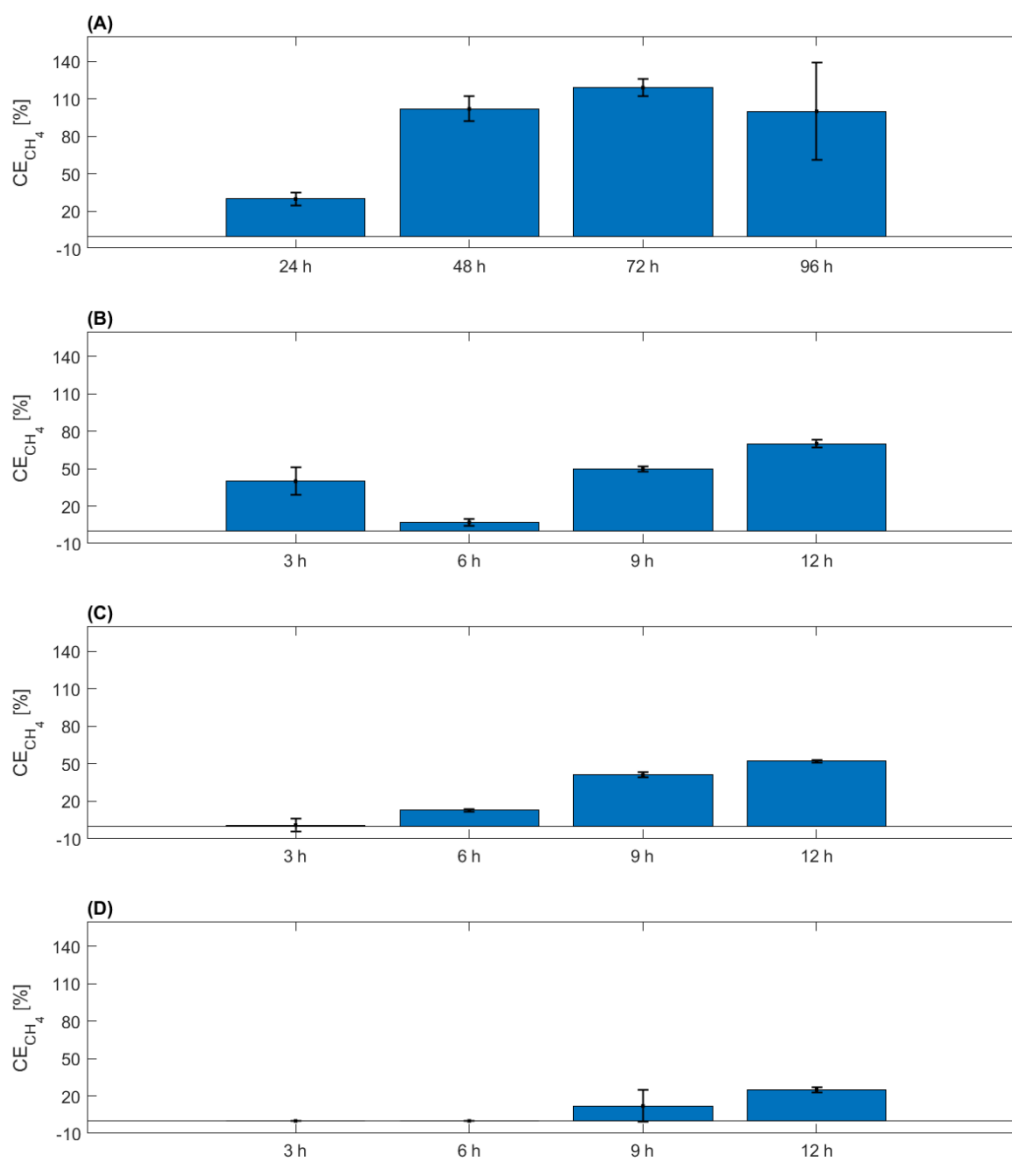


Abbildung 30 Coulombsche Effizienzen (A) Anwachphase, (B) 1. Tag des Tag-Nach-Rhythmus, (C) 2. Tag des Tag-Nach-Rhythmus, (D) 3. Tag des Tag-Nach-Rhythmus mit *Mc. maripaludis* (Doppelbestimmung)

Wie bereits erwähnt, erreichte Deutzmann *et al.* 2023 im Vergleich mit den CE-Werten dieser Arbeit eine immer gleichbleibend hohe CE von über 70 %. Jedoch wurden die H-Zellen von Deutzmann kontinuierlich mit frischem Medium mit einem Durchfluss von 2,5 – 3,2 mL/h durchgespült, welches verbrauchte Medienbestandteile auswäscht und frische Medienbestandteile hinzufügt [92]. In dieser Arbeit konnte eine ähnlich hohe CE nur kurzzeitig aufrechterhalten werden. Ein sehr wahrscheinlicher Grund für die Hemmung der Methanogenese könnte die Anhäufung von veränderten bzw. gealterten Medium sein. Die genaue Ursache der Hemmung konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht eindeutig geklärt werden. Die Vermutung, dass ein Zusammenhang mit der farblich eindeutig erkennbaren Oxidation von eisenhaltigen Verbindungen im Medium besteht, wurde in weiteren Versuchen durch die Zugabe von frischen Eisen-II-Salzen nicht bestätigt (Versuche dazu werden hier nicht näher beschrieben). Künftig ist die Erforschung der Stabilisierung des Prozesses ohne oder nur mit einem äußerst geringen und angepassten Austausch des Mediums erforderlich.

5.4.4 Rasterelektronenmikroskopie der Kathoden

Für die Untersuchung zur Bildung eines Biofilmes an den Kathoden aus dem Tag-Nacht-Versuch wurden diese fixiert und mit dem Rasterelektronenmikroskop fotografiert. In Abbildung 31 (A) ist die Elektrodenoberfläche des Reaktors 1 dargestellt. Auf der Oberfläche sind einzelne Kokken von *Mc. maripaludis* deutlich zu sehen. Jedoch konnte kein zusammenhängender Biofilm wie im Versuch mit kontinuierlich angelegter Spannung in der Abbildung 18 (E) beobachtet werden. Des Weiteren sind teilweise geplatze Kokken zu erkennen. Abbildung 31 (B) zeigt die Elektrodenoberfläche der Kathode des Reaktors 2. Auf dieser Elektrode sind keine voluminösen Kokken zu sehen. Im Vergleich zur Elektrode des Reaktors 1 sind hier lediglich organische Strukturen erkennbar. Diese sind teilweise kreisrund und erinnern nur etwas an eine Zelle (rote Kreise).

Die Aufnahmen zeigen, dass sich die Methanogenen an der Elektrode angesiedelt haben, jedoch scheinen die Umgebungsbedingungen für die Ausbildung eines stabilen Biofilms, wie unter konstanten Spannungsbedingungen (Abbildung 18 E), nicht geeignet gewesen zu sein. Deutzmann *et al.* 2023 konnte ebenfalls keinen signifikanten Biofilm bei der makroskopischen Untersuchung der Elektroden nach einem Versuch zur Simulation des Tag-Nacht-Rhythmus feststellen [92]. Elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden von Deutzmann nicht durchgeführt.

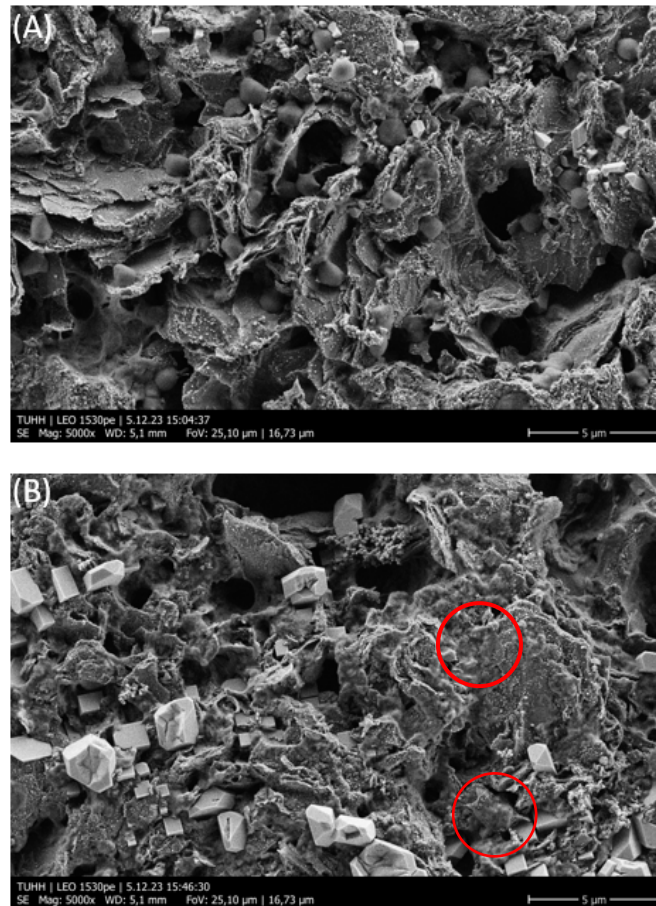


Abbildung 31 REM-Aufnahmen der Kathodenoberflächen nach dem Tag-Nacht-Rhythmus mit *Mc. maripaludis*. (A) Elektrodenoberfläche von Reaktor 1, (B) Elektrodenoberfläche von Reaktor 2. Die roten Kreise markieren kreisförmige organische Substanzen

5.4.5 Fazit über den Lastenwechsel in der großen H-Zelle

Ziel des Versuchs mit Lastenwechsel war es, zu klären, ob mittels der indirekten Elektromethanogenese eine systemdienliche Betriebsweise der Elektromethanogenese möglich ist. Dieses sollte anhand eines stark vereinfachten Stromproduktionsverhaltens einer Photovoltaikanlage geschehen. Für diese Betrachtung wurde der Stamm *Mc. maripaludis* verwendet und bei einem Tag-Nacht-Rhythmus von je 12 h bei -700 mV (Tag) und für 12 h bei $+200$ mV (Nacht) kultiviert.

Die Ergebnisse zeigen, dass prinzipiell die Elektromethanogenese systemdienlich betrieben werden kann. Jedoch zeigen die Ergebnisse ebenfalls, dass wahrscheinlich das Medium einen starken Einfluss auf die Effektivität des Prozesses hat. Sowohl die CE, die Zellzahl als auch die Methanproduktion sanken über die Versuchstage hin ab, während das Medium sich offensichtlich in seiner Chemie änderte, was an der deutlich sichtbaren Farbveränderung zu erkennen war. In der Publikation von Deutzmann *et al.* 2023 konnte eine konstante

Methanproduktion bei gleichbleibend hoher CE von über 70 % bei einem kontinuierlichen Austausch des Mediums erzielt werden.

Insgesamt zeigen die hier präsentierten Ergebnisse des Tag-Nacht-Versuchs sowie die Ergebnisse von mehreren unterschiedlichen Publikationen, dass die Elektromethanogenese unter intermittierender Stromzufuhr möglich ist [92,167,177,179].

Der Prozess der Elektromethanogenese lässt eine flexible Prozessführung zu und eignet sich daher zur systemdienlichen Energiespeicherung.

5.5 Untersuchung der Stabilität des Prozesses bei Medienwechsel

Die Untersuchung der Elektromethanogenese, insbesondere unter dem Lastenwechsel ergab, dass die CE über eine kurze Zeitspanne stark abfällt. Dieses trat bei einem konstanten Potential von -700 mV innerhalb von 96 h auf und bei Lastenwechsel bereits nach 72 h. In vergleichbarer Literatur wurde eine gleichbleibend hohe Effizienz sowie eine ebenfalls gleichbleibende hohe Methanproduktion durch einen kontinuierlichen Medienwechsel erreicht. Beispielsweise wurde innerhalb von 1,5 Tagen das komplette Medium (120 mL) ausgetauscht. Dadurch wurden beständig verbrauchte Medienbestandteile ausgespült und neue Medienbestandteile hinzugefügt [92].

In dem nachfolgend beschriebenen Experiment wurde das Medium im Kathodenraum zweimal nach je 96 h zu 50 % ausgetauscht und durch frisches Medium ersetzt. Die Zeitspanne von 96 h wurde nach den vorhergehenden Experimenten gewählt, da ab 96 h die CE leicht abfiel, siehe Abbildung 30. Ziel dieses Versuches war es, eine stabile Methanproduktion und ebenfalls eine gleichbleibend hohe CE zu erreichen. In dem hier beschriebenen Versuch wurde alle 24 h eine Probe der Gasphase genommen und mittels Gaschromatographen analysiert.

5.5.1 Physikochemische Daten

Wie in den vorherigen Versuchen in der großen H-Zelle wurden kontinuierlich der pH-Wert und der Druck aufgezeichnet. Der pH-Verlauf war vergleichbar zu den vorherigen Versuchen, siehe Abbildung 32. Im Kathodenbereich wurde bei einem pH-Wert von 6,5 begonnen. Innerhalb der ersten 96 h stieg der pH leicht auf 6,9 an. Deutlich ist durch den Medientausch zu erkennen, dass nach dem Wechsel der pH auf den ursprünglichen Anfangswert sank und genauso langsam im Verlauf weiterer 96 h wieder anstieg. Dieses wiederholte sich identisch mit dem 2. Medienwechsel. Im Anodenbereich fiel der pH-Wert beständig ab bis auf ein Minimum von 2,0, bedingt durch die Ansäuerung der Anodenseite. Der Druck reduzierte sich von anfangs 470 mbar auf ca. 100 mbar (Reaktor 1) bzw. 200 mbar (Reaktor 2), siehe Abbildung 33. Diese Druckminderung wurde durch das Lösen des CO₂ und dem Umsatz von diesem in Methan verursacht.

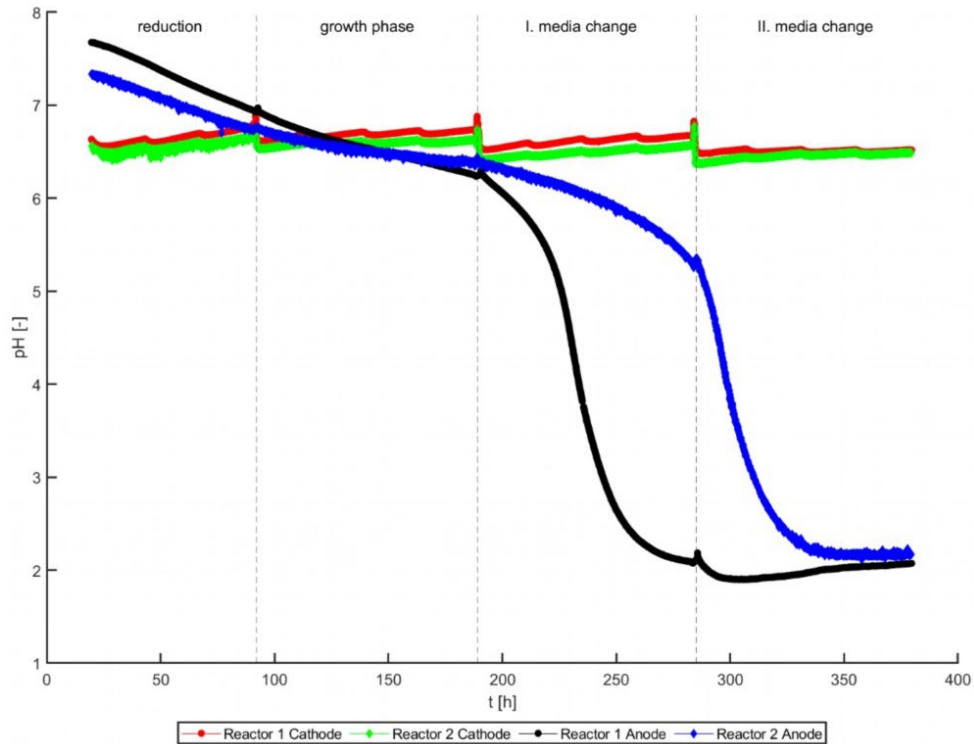


Abbildung 32 pH-Verlauf der Kathoden- und Anodenseite zu der Untersuchung der Stabilität der Elektromethanogenese in der großen H-Zelle mit *Mc. maripaludis*. Zu den Zeitpunkten I. und II. media change wurde das Medium der Kathodenseiten zu 50 % durch Frisches ersetzt

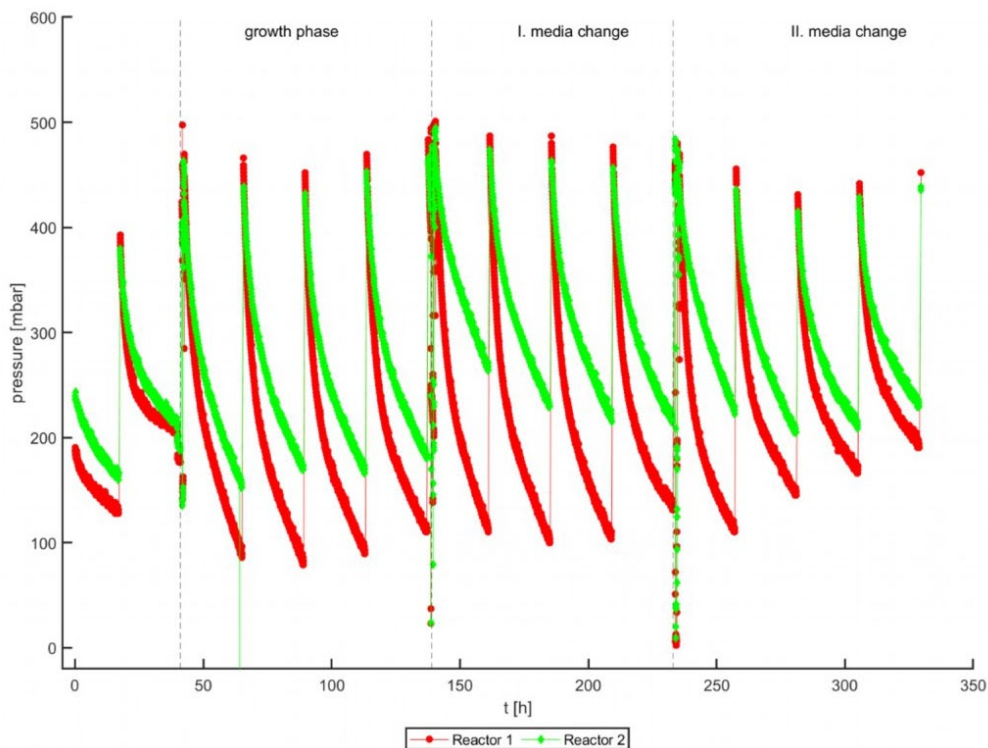


Abbildung 33 Druckverlauf zu der Untersuchung der Stabilität der Elektromethanogenese in der großen H-Zelle mit *Mc. maripaludis*. Zu den Zeitpunkten I. und II. media change wurde das Medium der Kathodenseiten zu 50 % durch Frisches ersetzt

5.5.2 Coulombsche Effizienz und Methanproduktion

Für die Untersuchung der Effizienz wurden in diesem Abschnitt die Δ Konzentrationen an Methan und damit die Methanproduktionsraten und die CE gemeinsam betrachtet, siehe Abbildung 34. Insgesamt sind drei Abschnitte dargestellt: Die Anwachsphase, der I. und der II. Medienwechsel.

Innerhalb von 24 h nach der Inokulation wurde eine CE von $12 \pm 6 \%$ erreicht. In der darauffolgenden Messung nach 48 h stieg die CE auf einen Wert von $106 \pm 63\%$ an und pendelte sich nach 72 h bei $89 \pm 20 \%$ ein. Die anfänglichen erheblichen Abweichungen wurden durch die unterschiedlich hohe Methanproduktion je nach Reaktor bedingt. Dabei stieg die Methanproduktionsrate für Reaktor 1 während der Anwachsphase von $2 \text{ mmol}/(\text{m}^2 \text{ d})$ auf $59 \text{ mmol}/(\text{m}^2 \text{ d})$ und für Reaktor 2 von $0,5 \text{ mmol}/(\text{m}^2 \text{ d})$ auf $62 \text{ mmol}/(\text{m}^2 \text{ d})$.

Nach dem ersten Medienwechsel konnte zunächst eine CE von $22 \pm 4 \%$ erreicht werden, welche innerhalb von 96 h auf eine CE von $126 \pm 4\%$ anstieg. Die Methanproduktion bei dieser Phase erhöhte sich parallel in beiden Reaktoren von $\sim 23 \text{ mmol}/(\text{m}^2 \text{ d})$ auf $\sim 140 \text{ mmol}/(\text{m}^2 \text{ d})$. 24 h nach dem zweiten Medienwechsel wurde zunächst eine CE von $27 \pm 1 \%$ erreicht, welche einen Höchstwert von $126 \pm 21 \%$ nach 72 h erlangte. Bei einer gemeinsamen Bilanzierung beider Reaktoren nach 96 h konnte eine CE von $92 \pm 49 \%$ erreicht werden. In Reaktor 1 betrug die Methanproduktionsrate nach 48 h das Maximum von $161 \text{ mmol}/(\text{m}^2 \text{ d})$, welches anschließend bis auf $43 \text{ mmol}/(\text{m}^2 \text{ d})$ abfiel. In Reaktor 2 wurde das Maximum von $148 \text{ mmol}/(\text{m}^2 \text{ d})$ erst nach 72 h erreicht. Die Methanbildungsrate fiel im weiteren Verlauf auf einen Wert von $137 \text{ mmol}/(\text{m}^2 \text{ d})$ nach 96 h ab. CE von über 100% können darauf hinweisen, dass die frisch zugefügten Medienbestandteile wie Cystein oder Fe^{2+} -Ionen als zusätzliche Elektronendonoren genutzt werden und somit zusätzliche Energie in der H-Zelle vorhanden ist, siehe Abschnitt 5.3.5.

Durch die Betrachtung der CE nach den Medienwechseln war zu erkennen, dass die Effizienz stark von den aktiven Methanogenen abhängig ist. Zunächst war zu beobachten, dass nach den beiden Medienwechseln die CE in beiden Reaktoren auf durchschnittlich 20% reduziert wurde. Dieser Abfall ist durch die Verminderung der Zellzahl im flüssigen Medium zu begründen, da die Hälfte des Mediums mit frischem unbewachsenem Medium ausgetauscht worden ist. Innerhalb eines Tages regenerierte sich die Zellzahl und es konnten CE von $> 70 \%$ erreicht werden. Dieses Verhalten zeigte, dass nicht nur der Biofilm an der Elektrode entscheidend ist, sondern ebenfalls die planktonischen Zellen einen Einfluss auf die jeweilige CE haben.

Die unterschiedlichen Messwerte und Leistungen der beiden Reaktoren können von mehreren Faktoren abhängig gewesen sein: Der Reaktorgeometrie (Variabilität der manuell gefertigten Reaktoren) und an den leichten unterschiedlichen pH-Werten nach dem Medienwechsel (Reaktor 1: 6,6 und Reaktor 2: 6,4).

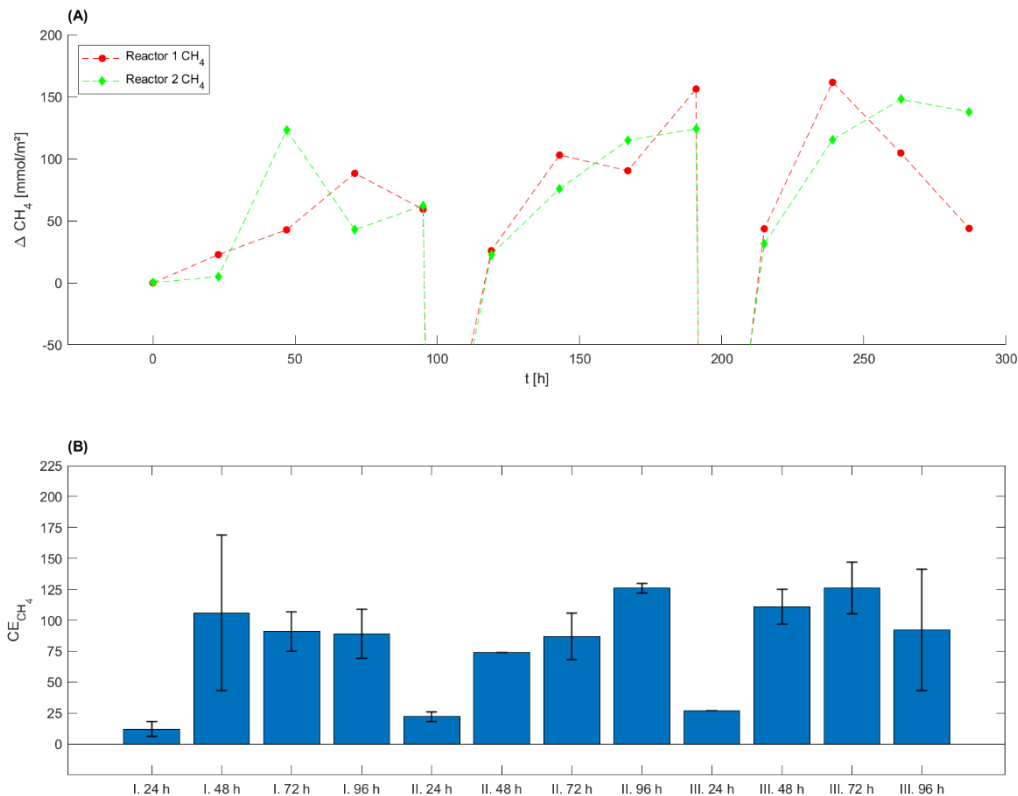


Abbildung 34 Bilanzierung zu der Untersuchung der Stabilität der Elektromethanogenese in der großen H-Zelle mit *Mc. maripaludis*. Zu den Zeitpunkten I. und II. media change wurde das Medium der Kathodenseiten zu 50 % durch Frisches ersetzt. (A) Δ der Methanproduktion und (B) CE

5.5.3 Chronoamperometrischen Messungen

Bei der Betrachtung der chronoamperometrischen Messungen konnten deutliche Unterschiede zu den vorherigen Versuchen beobachtet werden, siehe Abbildung 35. In den bisherigen Versuchen startete die Stromdichte jeweils bei ca. -1000 mA/m^2 , nach der Inokulation mit *Mc. maripaludis*. Anschließend erfolgte ein Anstieg der Stromdichte auf durchschnittlich -400 mA/m^2 . Im hier beschriebenen Versuch wurde das Medium, wie bei den vorherigen Versuchen, bei -700 mV ohne Kultur „vorreduziert“, um alle unspezifischen elektrochemischen Reaktionen ablaufen zu lassen. Dabei fiel die Stromdichte in beiden Reaktoren auf jeweils -1000 mA/m^2 ab, welches ähnlich ist zu den vorherigen Versuchen. Nach

der Inokulation (mit *Mc. maripaludis*) startete die Stromdichte bei ca. -1200 mA/m^2 und stieg nach 4 Tagen auf -600 mA/m^2 an. Anschließend erfolgte nach 96 h der erste Medienwechsel (Kathodenseite zu 50 % des Mediums). Nach dem Wechsel erreichte die Stromdichte einen Wert von ca. -1100 mA/m^2 und stieg nach 96 h auf -1000 mA/m^2 an. Bei dem zweiten Medienwechsel nach weiteren 96 h zeigte sich das gleiche Verhalten in Bezug auf die Stromdichte.

Das Hauptergebnis der Untersuchung zum Einfluss des Mediums auf die Leistung der Elektromethanogenese war, dass die Methanproduktion stabil auf einem niedrigen Niveau blieb, wenn das Medium bei einer Stromdichte von unter -1000 mA/m^2 periodisch erneuert wird. Im direkten Vergleich zu den vorherigen Versuchen in der großen H-Zelle, sollte das Medium bei der halben Reduktion der Stromdichte vom Anfangswert spätestens gewechselt werden, z. B. bei -600 mA/m^2 wenn der Anfangswert bei -1200 mA/m^2 lag. Ein anderer Ansatzpunkt wäre es das Medium *pro forma* alle 96 h zu wechseln.

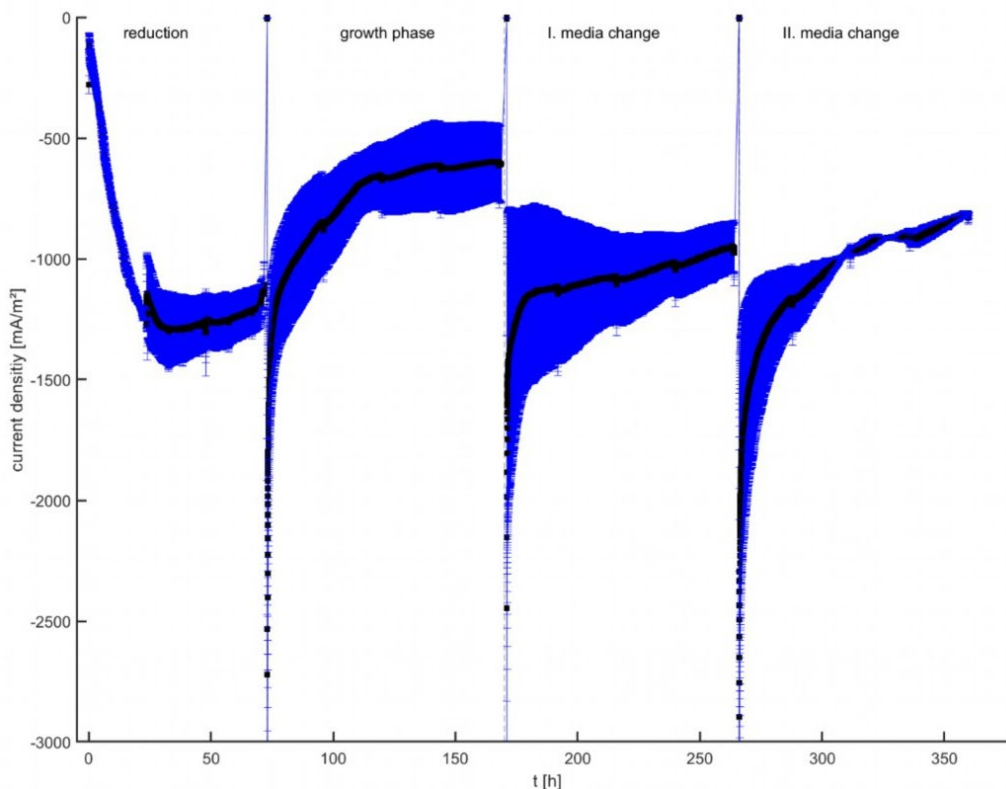


Abbildung 35 Chronoamperometrische Messung zu der Untersuchung der Stabilität der Elektromethanogenese in der großen H-Zelle mit *Mc. maripaludis*. Zu den Zeitpunkten I. und II. media change wurde das Medium der Kathodenseiten zu 50 % durch Frisches ersetzt.

5.5.4 Veränderungen der planktonischen Zellzahl durch den Medienwechsel

Der Medienwechsel alle 96 h zeigte, dass das Altern des Mediums einen Einfluss auf die CE und die Methanproduktion hat. Bei der Bestimmung der Stromdichten, der CE und der Methanproduktion konnte bereits der positive Einfluss eines periodischen Austauschs des Mediums erkannt werden. Die Zellzahl wurde jeweils zum Ende der Inkubation von der Anwachsphase und der jeweiligen Medienwechseln bestimmt, siehe Tabelle 28. Dabei konnte ein leichter Abfall der Zellzahl beobachtet werden, welches auf ein nicht vollständig ausgleichendes Zellwachstum der planktonischen Methanogenen nach den Medienwechseln hinweist.

Tabelle 28 Zellzahl pro mL der Untersuchung der Stabilität der Elektromethanogenese in großen H-Zelle mit *Mc. maripaludis*

Start	Anwachsphase	I. Medienwechsel	II. Medienwechsel
$1,9 \times 10^7 \pm 1,4 \times 10^6$	$3,8 \times 10^7 \pm 4,7 \times 10^6$	$2,7 \times 10^7 \pm 5,3 \times 10^6$	$2,2 \times 10^7 \pm 1,5 \times 10^7$

5.5.5 Untersuchung des gealterten Mediums auf das Wachstum von *Mc. maripaludis*

Nach den jeweiligen Medienwechseln wurde das entnommene, gealterte Medium steril filtriert, mit einer frischen Kultur von *Mc. maripaludis* beimpft und für 72 h bei 38 °C klassisch mit H₂:CO₂ (80:20) inkubiert. Anschließend erfolgten die Bestimmungen der Zellzahlen. Ziel dieses Versuches war es, den Einfluss des verbrauchten Mediums aus den Reaktoren auf das Wachstum einer frischen methanogenen Kultur zu testen, siehe Abbildung 36.

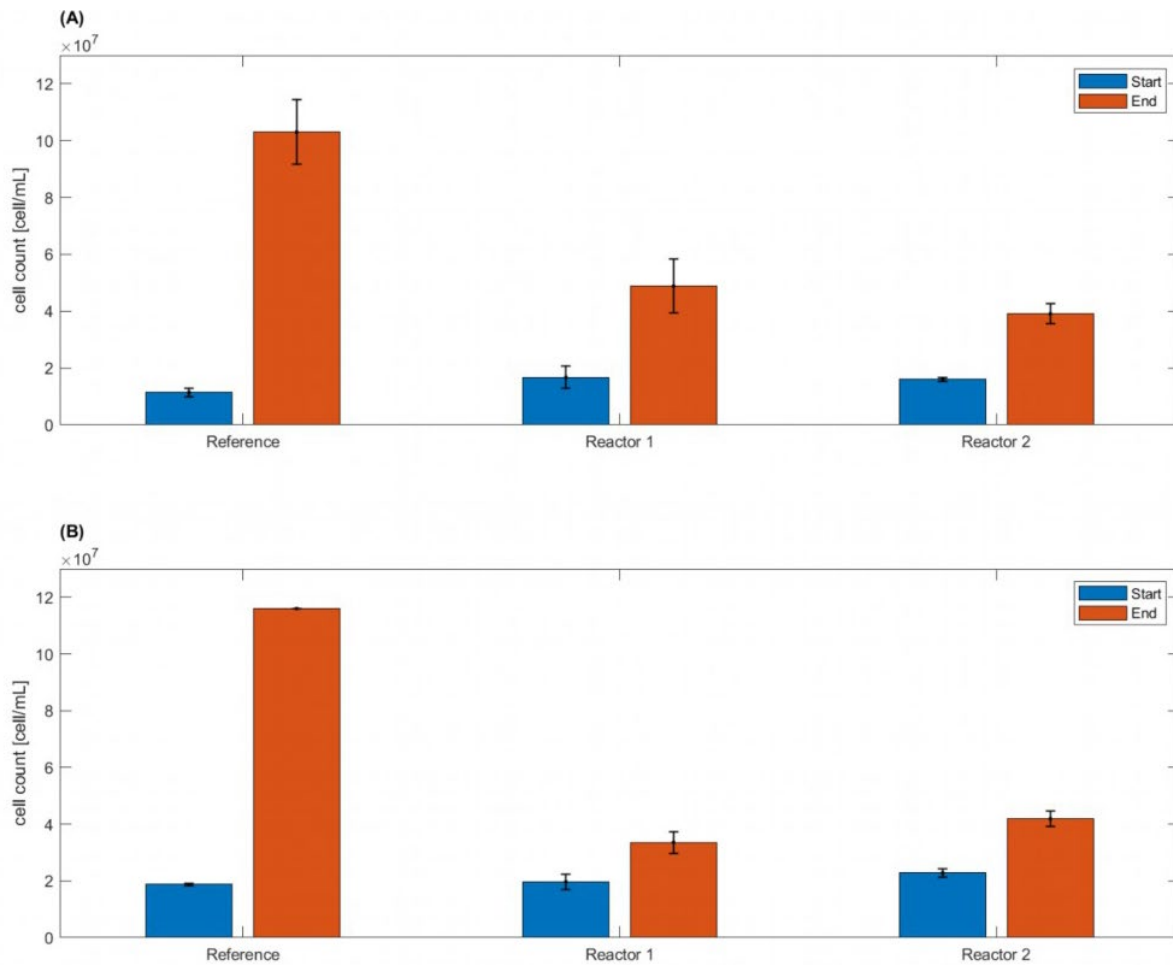


Abbildung 36 Zellzahlen nach der Inkubation mit einer frischen Kultur von *Mc. maripaludis* in dem entnommenen Medium nach den Medienwechseln. A) erster Medienwechsel, B) zweiter Medienwechsel

Die Ergebnisse zeigen klar, dass das aus dem Reaktor entnommene, gealterte Medium einen stark hemmenden Einfluss auf das Wachstum der Methanogenen hatte. Bei den Referenzen (frisches Medium mit frischer Kultur von *Mc. maripaludis*) konnte ein durchschnittlicher Anstieg der Zellzahl um das 7,5-fache im Vergleich zur Startkonzentration bestimmt werden. Die Zellzahlkonzentration in dem getauschten Medium des I. Medienwechsel stieg dagegen nur um das 2,6-fache an und beim des II. Medienwechsel um das noch geringere 1,8-fache.

Das verwendete Minimalmedium besteht aus einer Vielzahl unterschiedlicher Mineralien, siehe Abschnitt 4.1.1. Bei der Elektrolyse können sich diese Mineralien an der Elektrode anreichern. Dadurch verringert sich die bioverfügbare Konzentration im flüssigen Medium. Dieser Konzentrationsunterschied kann das Wachstum von Methanogenen hemmen, vor allem wenn wichtige Superelemente wie Nickel dem Medium „entzogen“ werden [12]. Ein weiterer Grund, warum das gealterte Medium hemmend auf die Methanogenese wirken könnte, sind die Änderung der Oxidationsstufen des Eisens. Für ein optimales Wachstum der Methanogenen

wurde dem Medium Fe^{2+} hinzugefügt, welches ein wichtiger Stoffwechselintermediat für die Methanogenese ist [182]. Innerhalb des Metabolismus von Methanogenen wird über die Heterodisulfid-Reduktase (HDrABC) die Spaltung von CoM-S-S-CoB katalysiert. Dieses Enzym benötigt Fe^{2+} -Ionen für die Bildung eines [Fe-S] Clusters [184,185]. Durch die Elektrolyse während der EM wird Fe^{2+} zu Fe^{3+} oxidiert, welches nicht mehr bioverfügbar ist und als gelblich bis rötlichbrauner Farbumschlag sichtbar ist. Eine solche Farbänderung war bei allen durchgeführten Versuchen sowohl in den kleinen H-Zellen als auch in den großen Reaktoren zu erkennen, siehe Abbildung 37. Durch den Verbrauch des Fe^{2+} bzw. der Oxidierung zu Fe^{3+} wird die Methanogenese stark gehemmt, welches mit großer Wahrscheinlichkeit ein Grund für das Absterben der Methanogenen nach längerer Versuchsdauer ohne Medienwechsel ist.



Abbildung 37 Eigenfärbung des Mediums im großen Reaktor (Reaktor 2) nach der Elektrofermentation bei -700 mV mit *Mc. maripaludis* nach dem II. Medienwechsel bei der Untersuchung der Stabilität der Elektromethanogenese, Kathode (links) Anode (rechts)

5.5.6 Rasterelektronenmikroskopie der Kathoden

Neben der quantitativen Erfassung der Zellzahl und der Betrachtung des Mediums wurden zusätzlich die Kathodenoberflächen der beiden Reaktoren mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht, siehe Abbildung 38. Auf den Oberflächen der Kathoden beider Reaktoren ist eine

Vielzahl von Methanogenen zu erkennen, welche die Grundlage für einen dichten Biofilm bilden könnten, wie in der Abbildung 18 (D - F) in den kleinen H-Zellen. Für eine vergleichbare Ausprägung des Biofilms wäre es erforderlich gewesen, den Versuch über einen noch längeren Zeitraum durchzuführen oder für das Beimpfen eine höhere Zellzahl zu nutzen, um ein ähnliches Verhältnis von Zellzahl zu Reaktorvolumen bzw. Kathodenoberfläche wie in den kleinen H-Zellen zu erhalten. Im Vergleich zu den kleinen H-Zell-Reaktoren haben die großen H-Zellen eine ca. dreimal größere Elektrodenoberfläche.

In der Abbildung 38 (A) ist die REM-Aufnahme der Kathodenoberfläche des Reaktors 1 dargestellt. Auf der Aufnahme ist zu erkennen, dass kokkenförmige Methanogene vorhanden sind. Jedoch haben diese nicht die typische Erscheinungsform von runden, voluminösen Kokken, wie in Abbildung 38 (B). Diese Kokken scheinen eher ausgetrocknet zu sein, ähnlich zu einer Rosine. Ähnliche Formen zeigt ebenfalls die Aufnahme in Abbildung 31 (B). Die ungesund erscheinende Morphologie weist auf eine Hemmung hin, deren genaue Ursache allerdings nicht bestimmt werden konnte. Die Methanproduktion sank in diesem Reaktor um das 10-fache. In der Aufnahme der Abbildung 38 (B) ist die Kathodenoberfläche des Reaktors 2 dargestellt. Nach dem II. Medienwechsel konnte im Gegensatz zu Reaktor 1 eine nahezu konstante Methanproduktion gemessen werden. Bei der Betrachtung der Kathode ist eine Vielzahl von voluminösen, methanogenen Kokken zu erkennen. Dieser intakte Biofilm trug mit wahrscheinlich zu der höheren Methanbildungsrate nach den Medienwechseln mit der einhergehenden verringerten planktonischen Zellzahl bei.

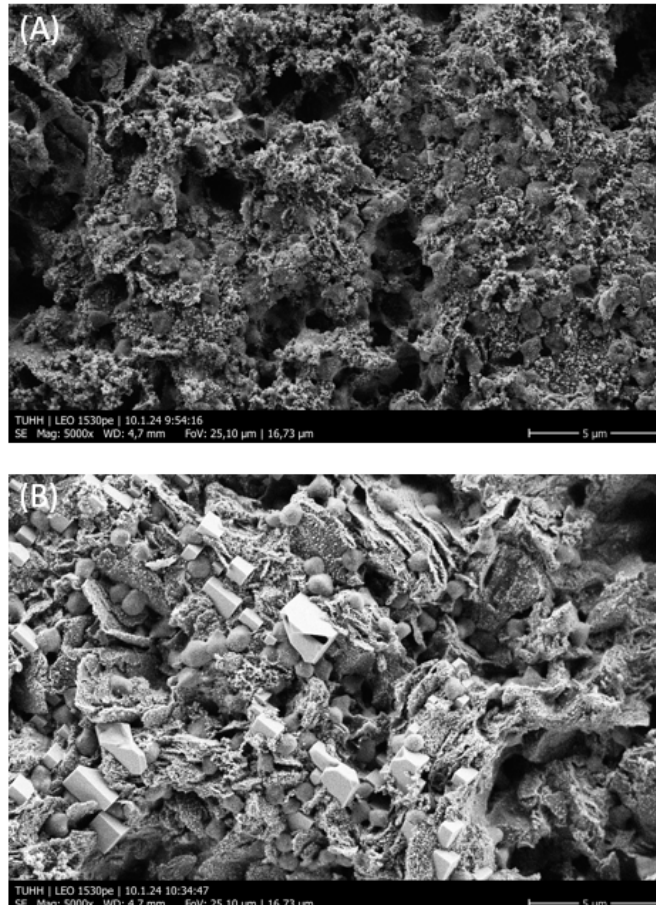


Abbildung 38 REM-Aufnahmen der Kathodenoberflächen nach dem Medienwechsel bei der Untersuchung der Stabilität der Elektromethanogenese. (A) Kathode von Reaktor 1, (B) Kathode von Reaktor 2

5.5.7 Fazit für Experimente im großen Reaktor

Der in diesen Abschnitt beschriebene Versuchsaufbau sollte den Einfluss eines kontinuierlichen Medienwechsels auf die CE und die Methanproduktion beschreiben. Es konnte gezeigt werden, dass ein kontinuierlicher Medienwechsel einen positiven Effekt auf die CE zeigt und eine gleichbleibende Methanproduktion zur Folge hat. Diese Ergebnisse sind ähnlich zu denen von Deutzmann *et al.* 2023 [92].

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ein gealtertes Medium einen negativen Effekt auf das Wachstum der Methanogenen hat. Im gealterten Medium liegt scheinbar ein Mangel an Fe^{2+} -Ionen vor. Das Medium färbte sich bei allen Experimenten über die Zeit von weißlich/bläulich (z. B. Fe(II) -Hydroxid) zu gelblich/rötlich bis hin zu bräunlich bei längerer Versuchsdauer über drei Wochen hinweg (z. B. in den Versuchen zum Einfluss unterschiedlicher Potentiale, Kapitel 5.3). Dieser Farbumschlag in das rostbraune kann aufgrund der Bildung von Fe(III) -Chlorid entstehen. Durch die Oxidation von Fe^{2+} zu Fe^{3+} ist

kein bioverfügbares Eisen mehr im Medium enthalten. Dieser Mangel hemmt das Wachstum der Methanogenen [184,185].

Des Weiteren zeigen die Ergebnisse zur Stabilität der Elektromethanogenese, dass nicht nur der Biofilm an der Elektrode entscheidend für eine hohe CE und Methanproduktion ist - vielmehr ist eine Interaktion zwischen den planktonisch wachsenden und im Biofilm lebenden Methanogenen entscheidend für eine hohe, konstante Methanproduktion [174]. Dieser Effekt konnte beim I. und bei II. Medienwechsel beobachtet werden. Zunächst ist die CE 24 h nach dem Wechsel auf durchschnittlich 20 % gefallen, da weniger aktiv Methan produzierende Methanogene vorhanden waren. Nach 48 h erholte sich die CE jeweils auf über 70 %, da vermutlich die „fehlenden“ Methanogenen nachgewachsen sind und somit mehr Wasserstoff in Kombination mit Kohlenstoffdioxid in Methan verstoffwechselt werden konnte.

Die Stabilität der Elektromethanogenese ist nur dann gewährleistet, wenn permanent genügend Spurenelemente zur Verfügung stehen. Ein Indikator für das Altern des Mediums stellt die Stromdichte dar. Sinkt diese unterhalb eines je nach Reaktordesign spezifischen Wertes, sollte zumindest ein Teil des Mediums ausgetauscht werden.

6 Zusammenfassung

Die Elektromethanogenese ist eine Power-to-Gas-Technologie, welche in dieser Arbeit als eine Möglichkeit zur künftigen Energiespeicherung betrachtet wird. Die Elektromethanogenese ist eine Sonderform der Methanogenese, bei der unter der Nutzung von Wasserstoff Kohlenstoffdioxid zu Methan reduziert wird. Bei der Elektromethanogenese wird anders als bei der klassischen Methanogenese weder Biomasse noch separater Wasserstoff dem System zugefügt. Stattdessen liefert ein angelegtes Spannungsfeld die benötigte Energie, um die mikrobielle Umwandlung des Kohlenstoffdioxids zu Methan zu ermöglichen. Basierend auf einer intensiven Literaturrecherche konnte festgestellt werden, dass sich Methan produzierende Mikroorganismen, die sogenannten Methanogenen, vor allem die Gattung *Methanobacterium sp.*, an der Elektrode als Biofilm anreichern. Des Weiteren untersuchten die meisten Forschungsgruppen die elektroaktiven Eigenschaften der Methanogenen (intensiv ab 2009 bis heute) bei einer Spannung, bei welcher abiotischer Wasserstoff an der Elektrode entsteht. Zudem konnte festgestellt werden, dass für bisherige Beschreibungen des Prinzips der Elektromethanogenese zumeist Mischkulturen verwendet wurden. Unter Verwendung von undefinierten mikrobiellen Kulturen konnten jedoch keine genauen Aussagen über die spezifischen Eigenschaften in Bezug auf die Elektromethanogenese einzelner Methanogener und damit einzelner Umwandlungspfade bzw. Zusammenhänge getroffen werden. Bei der Verwendung von Mischkulturen können syntrophe Interaktion eine maßgebliche Rolle spielen. Daher wurde in dieser Arbeit ganz bewusst auf die Verwendung von Reinkulturen, also Methanogene einer einzelnen Art, gesetzt. Als Grundfrage wurde zunächst untersucht, ob die Isolierung von robusten, elektroaktiven Methanogenen einer einzelnen Art aus einer Mischkultur über das Anlegen einer Spannung möglich ist. Die nach diesem Prinzip aus Gärresten von Biogasanlagen erfolgreich isolierten zwei methanogenen Stämme der Gattung *Methanobacterium sp.* wurden für weitere Untersuchungen der Elektromethanogenese eingesetzt. Zusätzlich zu diesen zwei methanogenen Stämmen wurden vier weitere Reinkulturen unterschiedlicher Methanogene genutzt, um das Gesamtsystem der Elektromethanogenese mit den zahlreichen Parametern zum Zweck einer Speichertechnologie zu untersuchen.

Einer wesentlicher Parameter der Elektromethanogenese ist das angelegte Potential und damit verbunden die Forschungsfrage, ob entweder die direkte oder die indirekte Elektromethanogenese für die neue Speichertechnologie besser geeignet ist. Zwischen den Potentialen von -244 mV bis -410 mV vs. Standardwasserstoffelektrode (SHE) wird kein

Wasserstoff abiotisch an der Elektrode gebildet. Unterhalb eines Potentials von -410 mV vs. SHE kann Wasserstoff an der Elektrode durch die elektrolytische Spaltung von Wasser entstehen. Für die Untersuchung einer direkten Elektromethanogenese, ohne abiotische Wasserstoffproduktion wurde ein Potential von -300 mV vs. SHE gewählt. Bei den Untersuchungen zur direkten Elektromethanogenese der sechs verschiedenen methanogenen Reinkulturen konnte bei diesem Potential bei keinem der Ansätze eine signifikante Methanproduktion festgestellt werden. Zur Untersuchung der indirekten Elektromethanogenese wurde ein Potential von -700 mV vs. SHE gewählt. Bei der nachweislich indirekten Elektromethanogenese konnte mit allen verwendeten Methanogenen eine aktive Methanproduktion nachgewiesen werden. Dabei zeigten die in dieser Arbeit isolierten methanogenen Stämme „Kultur EE“ und „Kultur K11“ zusammen mit *Methanococcus maripaludis* die höchsten Methanproduktionsraten. Kultur EE und K11 erzielten eine ca. zweifach höhere spezifische Methanproduktion als in vergleichbaren Publikationen mit unterschiedlichen Methanogenen. Eine bis zu sechsfach höhere tägliche Methanproduktionsrate konnte mit *Methanococcus maripaludis* bei einer Effizienz von bis zu 74 % erreicht werden. Bei allen drei Methanogenen wurde außerdem die Bildung eines dichten Biofilms an den Elektroden (Kathode) beobachtet. Die weniger effektiven Methanogenen zeigten dagegen nur einen geringen Bewuchs der Elektrode. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein dichter und intakter Biofilm sich positiv auf die Effizienz des Systems auswirkt.

Methanococcus maripaludis konnte, im Vergleich zu den fünf anderen untersuchten Methanogenen, in einem kleinen H-Zell-Testsystem am schnellsten eine hohe Effizienz erreichen. Dementsprechend wurde dieser Organismus ausgewählt und in einem größeren Testsystem untersucht, der in großen Teilen eigens konstruierten großen H-Zelle. In der remote steuerbaren großen H-Zelle (ca. 2 x 700 mL Gesamtvolumen) konnte minütlich genau der Druck, der pH-Wert sowie die Temperatur überwacht werden. Über den verwendeten Potentiostaten wurde parallel das vorgegebene Potential exakt gehalten. Eine automatisierte Probennahme mit angeschlossener gaschromatografischer Analyse ermöglichte die zeitgenauen Messungen der Gaszusammensetzung, insbesondere der Methan- und Wasserstoffproduktion. Zusätzlich bestand die Möglichkeit, Proben der Medien aus dem Reaktionsraum zu entnehmen und mittels mikrobieller und chemischer Analytik zu untersuchen. Durch das umfangreiche Monitoring wurde der Gesamtprozess der Elektromethanogenese genauer beschrieben. Die erhobenen Daten dienen als Grundlage für die Beurteilung eines späteren Betriebs unter den Einflüssen fluktuierender erneuerbarer Energien. Die Ergebnisse der Versuche in den großen H-Zelle bei ununterbrochener Spannung ohne Austausch des Mediums zeigten die Grenzen

eines stabilen Prozesses auf. Bei einem Potential von -800 mV vs. SHE konnte innerhalb von 48 h eine maximale Methanproduktionsrate von 940 mmol/(m² d) mit *Methanococcus maripaludis* erreicht werden. Bei einem Potential von -700 mV vs. SHE lag die Methanproduktion bei 40 mmol/(m² d). Unter stabilen Prozessbedingungen wurde eine Effizienz von 74 % erzielt.

Zur Untersuchung der Flexibilität der Elektromethanogenese als künftige Speichertechnologie wurde eine stark vereinfachte Photovoltaikanlage simuliert. Hierfür wurde abwechselnd für 12 Stunden ein Potential angelegt, in welchem konstant Methan produziert werden konnte und in den darauffolgenden 12 Stunden ein Potential, in dem die Elektromethanogenese nicht elektrochemisch begünstigt wird. Anhand der Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass eine solche flexible Prozessführung möglich ist. Es wurde jedoch deutlich, dass das Medium im Laufe des Prozesses altert und dadurch einen stark negativen Einfluss auf die erzielte Methanproduktion ausübt. Durch das Anlegen eines Potentials werden die im Medium vorhandenen Fe²⁺-Ionen zu Fe³⁺-Ionen oxidiert. Aus diesem Grund muss das Medium bei einer längeren Versuchsdauer als 96 h Stunden zum Erhalt der Effizienz batchweise oder kontinuierlich ausgetauscht werden.

7 Schlussfolgerung

Die Elektromethanogenese wurde erstmals 2009 als eine alternative Methode für die Energiespeicherung der Zukunft erwähnt [35]. Bis heute hat die innovative Idee hinter dieser Speichermethode nichts an Reiz verloren. Daher wird nach wie vor intensiv an dieser Methode geforscht und das Funktionsprinzip der Elektromethanogenese genauer beschrieben. Im Zuge dieser Arbeit stellte sich heraus, dass die meisten Publikationen Potentiale von <-410 mV genutzt haben. Unterhalb dieser Grenze wird Wasserstoff elektrochemisch an der Elektrode gebildet. Basierend auf einer eingehenden Literaturrecherche im Bereich der bioelektrochemischen Systeme entwickelten sich drei Fragestellungen für diese Arbeit:

Frage 1:

Ist es möglich, Methanogene mittels Anlegens einer Spannung zu isolieren, die leistungsstärkere Methanbildner als die entsprechenden Reinkulturen für die Elektromethanogenese darstellen?

Für die Beantwortung der 1. Frage wurden zwei unterschiedliche Isolierungsmethoden angewendet. Mit beiden Methoden wurde eine methanogene Kultur von *Methanobacterium formicicum* mit einer Sequenzähnlichkeit von 99,5 % bzw. 99,7 % isoliert. Die Kultur K11 (99,7 %) wurde durch die Methode Dilution-to-Extinction erhalten und die Kultur EE (99,5 %) durch das zusätzliche Anlegen einer Spannung. Durch das angelegte Potential sollten Methanogene angereichert werden, welche eine höhere Affinität haben, sich an der Elektrode anzusiedeln. Die elektrochemischen Versuche zeigten, dass die unter Spannung isolierte Kultur EE eine Coulombsche Effizienz (CE) von 65 % erreichte, die Kultur K11 eine CE von 76 % und eine Reinkultur von *Mb. formicicum* dagegen nur eine CE von 26 %. Beide Isolate erzielten damit eine deutlich höhere CE als die Reinkultur, unabhängig von der Art der Isolierungsmethode. Dabei konnte eine bloße Adaptierung an das verwendete Medium ausgeschlossen werden, da in der Voranzucht der Isolate ein anderes Medium als in den elektrochemischen Versuchen verwendet worden ist.

Die 1. Forschungsfrage kann folgendermaßen beantwortet werden: Es ist möglich, Methanogene über das Anlegen einer Spannung zu isolieren. Die Art der Isolierung und damit ein erhoffter Vorteil der unter Anlegen einer Spannung isolierten Kultur hatte in dieser Arbeit keinen wesentlichen Einfluss auf die Leistung innerhalb elektrochemischer Versuche. Die Kultur K11 konnte eine vergleichbare CE erreichen wie die Reinkultur von *Mc. maripaludis*

(aus Meeressumpfsedimenten) mit einer CE von 74 %. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass ein Grund für die leistungsstarke elektrochemische Umsetzung die Fähigkeit zur Bildung eines Biofilms an der Kathode ist. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der bewachsenen Kathoden belegen eindeutig einen Zusammenhang zwischen hoher CE und dichtem Bewuchs.

Frage 2:

Ist Wasserstoff essenziell für die Elektromethanogenese oder reichen Protonen und Elektronen für eine effektive Methanproduktion aus?

Für die Beantwortung der 2. Fragestellung wurde die Elektromethanogenese in zwei Kategorien unterteilt: In die direkte Elektromethanogenese und die indirekte Elektromethanogenese. Die direkte Elektromethanogenese beschreibt dabei die direkte Aufnahme der Elektronen von der Elektrode. Für die Untersuchung der direkten Elektromethanogenese wurde ein Potential von -300 mV gewählt, da bei diesem Potential die Methanogenese positiv beeinflusst und kein Wasserstoff abiotisch gebildet wird [41]. Die hier beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass mit der direkten Elektromethanogenese keine signifikante Methanproduktion erzielt werden kann. Ähnliche Ergebnisse zeigte die Arbeitsgruppe von Lohner *et al.* 2014, welche mittels einer Selektionsmutante eine Wasserstoffverwertung ausgeschlossen haben und so die direkte Elektromethanogenese auch bei Potentialen unterhalb von -410 mV (Bildungsgrenze für abiotischen Wasserstoff) messen konnten. Sie erzielten lediglich eine Methanproduktion von 6 $\mu\text{mol}/150\text{ h}$ (0,96 $\mu\text{mol}/\text{d}$) [122].

Eine indirekte Elektromethanogenese liegt vor, wenn Wasserstoff direkt an der Elektrode produziert wird. Dieser Wasserstoff wird anschließend von den Methanogenen in Methan umgewandelt, unter der Nutzung von CO_2 . Für die Untersuchung dieses zweistufigen Prozesses wurde ein Potential von -700 mV gewählt, da bei diesem Potential eine deutliche Wasserstoffproduktion in den abiotischen Versuchsreihen detektiert wurde. Die Ergebnisse zeigen, dass die Kultur *Mc. maripaludis* unter den hier beschriebenen Bedingungen eine der höchsten CE von 74 % mit einer Methanproduktion über 72 h von 199 mmol/m^2 erreicht. Die Kultur K11 erlangt eine leicht höhere CE von 76 % mit einer Methanproduktion über 72 h von 165 mmol/m^2 . Vergleichbare Publikationen zeigen ähnlich hohe CE bzw. Methanproduktionsraten [55,69].

Die 2. Fragestellung kann basierend auf den hier beschriebenen Ergebnissen folgendermaßen beantwortet werden: Für eine industrielle Anwendung der Elektromethanogenese muss die

indirekte Elektromethanogenese gewährleistet werden, da nur unter dieser Bedingung ausreichend hohe Methanproduktionsraten erzielt werden können. Diese wurden vor allem mit der Kultur von *Mc. maripaludis* und der Kultur K11 erreicht. Aufgrund ihrer minimalen Umsatzrate kann die reine direkte Elektromethanogenese nicht für industrielle Anwendungen genutzt werden.

Frage 3:

Ist es möglich, die Elektromethanogenese unter intermittierenden Potentialen zu betreiben?

Für die Beantwortung der 3. Fragestellung wurde die beste Kultur der vorhergehenden Experimente, *Mc. maripaludis*, in die große H-Zelle unter variierenden Spannungseinflüssen getestet. *Mc. maripaludis* wurde für diese Versuche verwendet, da diese die höchste Methanproduktionsrate und eine hohe CE erzielte.

Die große H-Zelle weist im Vergleich zu den kleinen H-Zellen ein etwa dreifaches Reaktionsvolumen von 350 mL auf und beinhaltet automatisch regelbare Potentiale sowie kontinuierliche Messungen des pH-Werts, der Temperatur und des Druckes. Die Potentialgrenze in der großen H-Zelle liegt für *Mc. maripaludis* bei -800 mV. Bei diesem Potential wird die Methanproduktion kurzzeitig stark gesteigert, führt jedoch nach kurzer Zeit (24 Stunden) zu einer starken Hemmung der Methanogenese und zu einem Absterben der Kultur. Bei einem Potential von -700 mV läuft die Elektromethanogenese ausreichend stabil. Zusätzlich stabilisierte die Zugabe von reinem CO₂ den pH-Wert zwischen 6,6 - 7,0. Unter diesen Bedingungen wurde die Elektromethanogenese unter intermittierenden Potentialen einer simulierten Fotovoltaikanlage untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass eine systemdienliche Betriebsweise grundsätzlich möglich ist. Eine Langzeitstabilität der Elektromethanogenese ohne Medienwechsel konnte bisher noch nicht erreicht werden. Ein Grund hierfür kann ein Mangel an bioverfügbaren Spurenelementen, insbesondere von Eisen-(II)-Ionen, sein. Die Ergebnisse dieser Arbeit und von vergleichbarer Literatur zeigen, dass bei einem kontinuierlichen Wechsel des Mediums stabil hohe CE und Methanproduktionsraten erreicht werden können [92].

Die 3. Fragestellung kann folgendermaßen beantwortet werden: Die Elektromethanogenese kann unter intermittierenden Potentialen betrieben werden. Somit ist die Elektromethanogenese für eine systemdienliche Betriebsweise geeignet.

8 Ausblick

Die Elektromethanogenese ist eine neuartige Methode für die Speicherung von erneuerbaren Energien, bei der Überschussstrom in Moleküle, z. B. Methan, umgewandelt werden kann [186]. Der Vorteil an Molekülen ist, dass diese ihre Energie nicht über die Zeit verlieren können, im Gegensatz zu Batterien. Im Fall von Methan kann auf eine bereits gut ausgebaute Infrastruktur für die Speicherung zurückgegriffen werden.

Der technologische Reifegrad der Elektromethanogenese ist noch gering und befindet sich derzeit im Labormaßstab. Die Gründe hierfür sind vielfältig. Dabei spielt das Up-Scaling des Reaktors eine entscheidende Rolle, da eine herkömmliche H-Zelle, wie sie in dieser Arbeit verwendet wird, nicht einfach hochskaliert werden kann. Für eine künftige industrielle Anwendung sollte zunächst ein System entwickelt werden, welches nicht mehr auf einer gläsernen H-Zelle basiert. Ein Glas-Reaktor ist nur bedingt für eine großtechnische Anwendung geeignet. Des Weiteren ist der Abstand der Elektroden in der in dieser Arbeit zum Einsatz kommenden großen H-Zelle zueinander zu groß. Durch eine Verminderung des Elektrodenabstandes kann ein Spannungsabfall minimiert und ein besserer Stromfluss erreicht werden. Ein kompaktes Reaktordesign könnte für ein Numbering-Up genutzt werden. Hierfür sollte die gläserne H-Zelle in eine modulare planare oder tubuläre Zelle überführt werden. Dadurch kann bei entsprechendem Design ein möglichst geringer Abstand realisiert werden. Die Wahl von kostengünstigen Materialien wird dabei die Entwicklung zur Marktreife deutlich beschleunigen, da aktuelle Systeme sich teilweise erst nach 50 Jahren rentieren würden [102,187].

Bei einer modularen Bauweise könnten die einzelnen Module anschließend in großer Stückzahl angefertigt werden. Durch die Aufteilung in Stacks, ähnlich zu Elektrolysezellen, kann ein kostengünstiges System geschaffen werden. Eine solche modulare Bauweise könnte mit einer Zero-Gap Architektur realisiert werden [153,188]. Mit der Zero-Gap Architektur konnten Deutzmann *et al.* 2025 coulombsche Effizienzen von über 75% erreichen. Jedoch lag die Gesamt-Energieeffizienz des genutzten Systems nur bei 30% [189].

Der Einsatz von atmosphärischen Kohlenstoffdioxid, z. B. durch die DAC-Technologie abgeschieden oder CO₂ biogenen Ursprungs sowie grünem Strom in der Elektromethanogenese würde zu einer besonders nachhaltigen, CO₂-neutralen Herstellung von Methan führen.

Basierend auf der Technik der mikrobiellen Elektrosynthese können in nahezu baugleichen Reaktorsystemen und ebenfalls unter der Nutzung von atmosphärischen oder biogenem CO₂

weitere kurzkettige Moleküle hergestellt werden, z. B. niedere organische Säuren wie Essigsäure, Propansäure oder Buttersäure, aber auch kurzkettige Alkohole. Diese können als fossilfreie industrielle Grundchemikalien genutzt werden [186,190]. Dafür müssen jedoch anstatt Methanogene andere Mikroorganismen wie z. B. *Moorella sp.* oder *Clostridium sp.* verwendet werden [186,191].

Ein weiterer Ansatzpunkt für eine leistungsstärkere Elektromethanogenese wäre ein erweitertes Screening nach noch leistungsstärkeren Methanogenen sowie der genaueren genetischen Untersuchung der Elektromethanogenese, z. B. die Regulierung der Hydrogenasen, welche einen Einfluss auf höhere und stabilere Coulombsche Effizienzen haben könnten.

Des Weiteren sollte ein Medium gefunden/entwickelt werden, welches besonders kostengünstig ist. Eine Möglichkeit könnte ein angepasstes Medium auf Basis von Meereswasser sein, da dieses neben der benötigten Leitfähigkeit bereits ein breites Spektrum an Spurenelementen aufweist, die nicht teuer separat hinzugesetzt werden müssten. Zudem stammen mehrere Methanogene u. a. auch *Mc. maripaludis* aus marinen Habitaten.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Elektromethanogenese als mögliche Technologie für die Speicherung von erneuerbaren Energien untersucht. Mit der indirekten Elektromethanogenese lässt sich mit einer Effizienz von über 70 % mikrobiell CO₂ mit Strom in Methan umwandeln. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse und Erkenntnisse dienen als Grundlage für die Erhöhung des technologischen Reifegrades der Elektromethanogenese als eine künftige Speichertechnologie.

IV Literaturverzeichnis

1. Sabour, M.R.; Sadeghi-Sheshdeh, A.; Mohammadi, F.; Amiri, E.A. Global Trends and Status in Bioenergy Research During the Years 2000-2020: a Systematic Analysis. *Biomechanism and Bioenergy Research* **2021**, doi:10.21203/rs.3.rs-545873/v1.
2. Völler, D.; Wirth, V.; Ehret, R. Evaluation of Bioelectromethanogenesis Part II: Environmental Impact. *Chemie Ingenieur Technik* **2020**, doi:10.1002/cite.201900182.
3. Thanarasu, A.; Periyasamy, K.; Subramanian, S. An integrated anaerobic digestion and microbial electrolysis system for the enhancement of methane production from organic waste: Fundamentals, innovative design and scale-up deliberation. *Chemosphere* **2022**, 287, 1–14, doi:10.1016/j.chemosphere.2021.131886.
4. Bajracharya, S.; Srikanth, S.; Mohanakrishna, G.; Zacharia, R.; Strik, D.P.; Pant, D. Biotransformation of carbon dioxide in bioelectrochemical systems: State of the art and future prospects. *Journal of Power Sources* **2017**, 356, 256–273, doi:10.1016/j.jpowsour.2017.04.024.
5. Zhao, Z.; Zhang, Y. A Promising Strategy for Renewable Energy Recovery **2020**, 71–94, doi:10.1002/9783527343829.ch3.
6. Paltsev, S.; Morris, J.; Kheshgi, H.; Herzog, H. Hard-to-Abate Sectors: The role of industrial carbon capture and storage (CCS) in emission mitigation. *Applied Energy* **2021**, 300, 1–11, doi:10.1016/j.apenergy.2021.117322.
7. Geppert, F.; Liu, D.; van Eerten-Jansen, M.; Weidner, E.; Buisman, C.; Ter Heijne, A. Bioelectrochemical Power-to-Gas: State of the Art and Future Perspectives. *Trends Biotechnol.* **2016**, 34, 879–894, doi:10.1016/j.tibtech.2016.08.010.
8. Luton, P.E.; Wayne, J.M.; Sharp, R.J.; Riley, P.W. The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology* **2002**, 148, 3521–3530.
9. Choi, O.; Sang, B.-I. Extracellular electron transfer from cathode to microbes: application for biofuel production. *Biotechnol. Biofuels* **2016**, 9, 11, doi:10.1186/s13068-016-0426-0.
10. Dykstra, C.M.; Pavlostathis, S.G. Hydrogen sulfide affects the performance of a methanogenic bioelectrochemical system for biogas upgrading. *Water Res.* **2021**, 117268, doi:10.1016/j.watres.2021.117268.

11. Zhen, G.; Lu, X.; Kobayashi, T.; Kumar, G.; Xu, K. Promoted electromethanogenesis in a two-chamber microbial electrolysis cells (MECs) containing a hybrid biocathode covered with graphite felt (GF). *Chemical Engineering Journal* **2016**, *284*, 1146–1155, doi:10.1016/j.cej.2015.09.071.
12. Thauer, R.K.; Kaster, A.-K.; Goenrich, M.; Schick, M.; Hiromoto, T.; Shima, S. Hydrogenases from methanogenic archaea, nickel, a novel cofactor, and H₂ storage. *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 507–536, doi:10.1146/annurev.biochem.030508.152103.
13. Enzmann, F.; Gronemeier, D.; Holtmann, D. Evaluation of Bioelectromethanogenesis Part I: Energy Calculations. *Chemie Ingenieur Technik* **2020**, *92*, 137–143, doi:10.1002/cite.201900106.
14. Fruehauf, H.M.; Enzmann, F.; Harnisch, F.; Ulber, R.; Holtmann, D. Microbial Electrosynthesis - An Inventory on Technology Readiness Level and Performance of Different Process Variants. *Biotechnol. J.* **2020**, e2000066, doi:10.1002/biot.202000066.
15. Baker, B.J.; Anda, V. de; Seitz, K.W.; Dombrowski, N.; Santoro, A.E.; Lloyd, K.G. Diversity, ecology and evolution of Archaea. *Nat. Microbiol.* **2020**, doi:10.1038/s41564-020-0715-z.
16. DeLong, E.F. Archaea in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*, 5685–5689, doi:10.1073/pnas.89.12.5685.
17. Whitman, W.B.; Bowen, T.L.; Boone, D.R. The Methanogenic Bacteria. In *The Prokaryotes: Other major lineages of bacteria and the archaea*, 4. ed.; Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F., Eds.; Springer Berlin Heidelberg; Springer: Berlin, Heidelberg, **2014**; pp 123–163, ISBN 978-3-642-38953-5.
18. Kurth, J.M.; Op den Camp, H.J.M.; Welte, C.U. Several ways one goal-methanogenesis from unconventional substrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, doi:10.1007/s00253-020-10724-7.
19. Shima, S.; Huang, G.; Wagner, T.; Ermler, U. Structural Basis of Hydrogenotrophic Methanogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* **2020**, *74*, 713–733, doi:10.1146/annurev-micro-011720-122807.
20. Graham, D.E.; White, R.H. Elucidation of methanogenic coenzyme biosyntheses: from spectroscopy to genomics. *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 133–147, doi:10.1039/b103714p.
21. Thauer, R.K.; Kaster, A.-K.; Seedorf, H.; Buckel, W.; Hedderich, R. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, *6*, 579–591, doi:10.1038/nrmicro1931.

22. Costa, K.C.; Leigh, J.A. Metabolic versatility in methanogens. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2014**, *29*, 70–75, doi:10.1016/j.copbio.2014.02.012.
23. Thauer, R.K. The Wolfe cycle comes full circle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 15084–15085, doi:10.1073/pnas.1213193109.
24. Deppenmeier, U.; Lienard, T.; Gottschalk, G. Novel reactions involved in energy conservation by methanogenic archaea. *FEBS Letters* **1999**, *457*, 291–297, doi:10.1016/S0014-5793(99)01026-1.
25. Enzmann, F.; Mayer, F.; Rother, M.; Holtmann, D. Methanogens: Biochemical background and biotechnological applications. *AMB Express* **2018**, *8*, 1, doi:10.1186/s13568-017-0531-x.
26. Schäfer, G.; Engelhard, M.; Müller, V. Bioenergetics of the Archaea. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **1999**, *63*, 570–620.
27. Schlegel, K.; Müller, V. Evolution of Na(+) and H(+) bioenergetics in methanogenic archaea. *Biochem. Soc. Trans.* **2013**, *41*, 421–426, doi:10.1042/BST20120294.
28. Jones, W.L.; Nagle, D.P., JR.; Whitman, W.B. Methanogens and the Diversity of Archaeobacteria. *MICROBIOLOGICAL REVIEWS* **1987**, *51*, 135–177.
29. Jarrell, K.F.; Kalmokoff, M.L. Nutritional requirements of the methanogenic archaeobacteria. *Can. J. Microbiol.* **1988**, *34*, 557–576, doi:10.1139/m88-095.
30. Tamisier, M.; Schmidt, M.; Vogt, C.; Kümmel, S.; Stryhanyuk, H.; Musat, N.; Richnow, H.-H.; Musat, F. Iron corrosion by methanogenic archaea characterized by stable isotope effects and crust mineralogy. *Environ. Microbiol.* **2022**, *24*, 583–595, doi:10.1111/1462-2920.15658.
31. Duin, E.C.; Prakash, D.; Brungess, C. Methyl-coenzyme M reductase from *Methanothermobacter marburgensis*. *Meth. Enzymol.* **2011**, *494*, 159–187, doi:10.1016/B978-0-12-385112-3.00009-3.
32. Schut, G.J.; Haja, D.K.; Feng, X.; Poole, F.L.; Li, H.; Adams, M.W.W. An Abundant and Diverse New Family of Electron Bifurcating Enzymes With a Non-canonical Catalytic Mechanism. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, doi:10.3389/fmicb.2022.946711.
33. Bellini, R.; Bassani, I.; Vizzarro, A.; Azim, A.A.; Vasile, N.S.; Pirri, C.F.; Verga, F.; Menin, B. Biological Aspects, Advancements and Techno-Economical Evaluation of Biological Methanation for the Recycling and Valorization of CO₂. *Energies* **2022**, *15*, 4064, doi:10.3390/en15114064.

34. Baransi-Karkaby, K.; Hassanin, M.; Muhsein, S.; Massalha, N.; Sabbah, I. Innovative ex-situ biological biogas upgrading using immobilized biomethanation bioreactor (IBBR). *Water Sci. Technol.* **2020**, *81*, 1319–1328, doi:10.2166/wst.2020.234.
35. Cheng, S.; Xing, D.; Call, D.F.; Logan, B.E. Direct Biological Conversion of Electrical Current into Methane by Electromethanogenesis. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43*, 3953–3958, doi:10.1021/es803531g.
36. Bajracharya, S.; Krige, A.; Matsakas, L.; Rova, U.; Christakopoulos, P. Advances in cathode designs and reactor configurations of microbial electrosynthesis systems to facilitate gas electro-fermentation. *Bioresour. Technol.* **2022**, 127178, doi:10.1016/j.biortech.2022.127178.
37. Lin, R.; Deng, C.; Zhang, W.; Hollmann, F.; Murphy, J.D. Production of Bio-alkanes from Biomass and CO₂. *Trends Biotechnol.* **2021**, *39*, 370–380, doi:10.1016/j.tibtech.2020.12.004.
38. Potter, M.C. Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds. *Proc. R. Soc. Lond. B* **1911**, *84*, 260–276, doi:10.1098/rspb.1911.0073.
39. Rabaey, K.; Rozendal, R.A. Microbial electrosynthesis - revisiting the electrical route for microbial production. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 706–716, doi:10.1038/nrmicro2422.
40. Cheng, S.; Logan, B. Electromethanogenic Reaktor and Processes for Methane Production. 12/488,951, June 22, 2009.
41. Ragab, A.; Shaw, D.R.; Katuri, K.P.; Saikaly, P.E. Effects of set cathode potentials on microbial electrosynthesis system performance and biocathode methanogen function at a metatranscriptional level. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 19824, doi:10.1038/s41598-020-76229-5.
42. Kobayashi, H.; Toyoda, R.; Miyamoto, H.; Nakasugi, Y.; Momoi, Y.; Nakamura, K.; Fu, Q.; Maeda, H.; Goda, T.; Sato, K. Analysis of a Methanogen and an Actinobacterium Dominating the Thermophilic Microbial Community of an Electromethanogenic Biocathode. *Archaea* **2021**, *2021*, 1–13, doi:10.1155/2021/8865133.
43. Pelaz, G.; Carrillo-Peña, D.; Morán, A.; Escapa, A. Electromethanogenesis at medium-low temperatures: Impact on performance and sources of variability. *Fuel* **2022**, *310*, 1–8, doi:10.1016/j.fuel.2021.122336.
44. Carrillo-Peña, D.; Mateos, R.; Morán, A.; Escapa, A. Reduced graphene oxide improves the performance of a methanogenic biocathode. *Fuel* **2022**, *321*, 1–11, doi:10.1016/j.fuel.2022.123957.

45. Zhang, Z.; Lu, X.; Niu, C.; Cai, T.; Wang, N.; Han, Y.; Zhang, R.; Song, Y.; Zhen, G. Clarifying catalytic behaviors and electron transfer routes of electroactive biofilm during bioelectroconversion of CO₂ to CH₄. *Fuel* **2022**, *310*, 1–11, doi:10.1016/j.fuel.2021.122450.
46. Sonawane, J.M.; Re, Z.J.; Pant, D. *Pathways to Water Sector Decarbonization, Carbon Capture and Utilization*; IWA Publishing: Erscheinungsort nicht ermittelbar, **2022**, ISBN 9781789061796.
47. Lovley, D.R. Electrotrophy: Other microbial species, iron, and electrodes as electron donors for microbial respirations. *Bioresour. Technol.* **2022**, *345*, 1–12, doi:10.1016/j.biortech.2021.126553.
48. Zhou, H.; Xing, D.; Xu, M.; Su, Y.; Ma, J.; Angelidaki, I.; Zhang, Y. Optimization of a newly developed electromethanogenesis for the highest record of methane production. *J. Hazard. Mater.* **2021**, *407*, 1–10, doi:10.1016/j.jhazmat.2020.124363.
49. Deppenmeier, U. The membrane-bound electron transport system of *Methanosarcina* species. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2004**, *36*, 55–64, doi:10.1023/b:jobb.0000019598.64642.97.
50. Maestrojuán, G.M.; Boone, D.R. Characterization of *Methanosarcina barkeri* MST and 227, *Methanosarcina mazei* S-6T, and *Methanosarcina vacuolata* Z-761T. *International Journal of Systematic Bacteriology* **1991**, *41*, 267–274, doi:10.1099/00207713-41-2-267.
51. Burdukiewicz, M.; Gagat, P.; Jabłoński, S.; Chilimoniuk, J.; Gaworski, M.; Mackiewicz, P.; Marcin, Ł. PhyMet2 : a database and toolkit for phylogenetic and metabolic analyses of methanogens. *Environ. Microbiol. Rep.* **2018**, *10*, 378–382, doi:10.1111/1758-2229.12648.
52. Rowe, A.R.; Xu, S.; Gardel, E.; Bose, A.; Girguis, P.; Amend, J.P.; El-Naggar, M.Y. Methane-Linked Mechanisms of Electron Uptake from Cathodes by *Methanosarcina barkeri*. *MBio* **2019**, *10*, 1–12, doi:10.1128/mBio.02448-18.
53. Cuzin, N.; Ouattara, A.S.; Labat, M.; Garcia, J.L. *Methanobacterium congolense* sp. nov., from a methanogenic fermentation of cassava peel. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2001**, *51*, 489–493, doi:10.1099/00207713-51-2-489.
54. Maus, I.; Kim, Y.S.; Wibberg, D.; Stolze, Y.; Off, S.; Antonczyk, S.; Pühler, A.; Scherer, P.; Schlüter, A. Biphasic Study to Characterize Agricultural Biogas Plants by High-Throughput 16S rRNA Gene Amplicon Sequencing and Microscopic Analysis. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *27*, 321–334, doi:10.4014/jmb.1605.05083.

55. Mayer, F.; Enzmann, F.; Lopez, A.M.; Holtmann, D. Performance of different methanogenic species for the microbial electrosynthesis of methane from carbon dioxide. *Bioresour. Technol.* **2019**, *289*, 1–10, doi:10.1016/j.biortech.2019.121706.
56. Chellapandi, P.; Bharathi, M.; Sangavai, C.; Prathiviraj, R. *Methanobacterium formicicum* as a target rumen methanogen for the development of new methane mitigation interventions: A review. *Vet. Anim. Sci.* **2018**, *6*, 86–94, doi:10.1016/j.vas.2018.09.001.
57. Bryant, M.P.; Boone, D.R. Isolation and Characterization of *Methanobacterium formicicum* MF. *International Journal of Systematic Bacteriology* **1987**, *37*, 171, doi:10.1099/00207713-37-2-171.
58. Salvador, A.F.; Martins, G.; Melle-Franco, M.; Serpa, R.; Stams, A.J.M.; Cavaleiro, A.J.; Pereira, M.A.; Alves, M.M. Carbon nanotubes accelerate methane production in pure cultures of methanogens and in a syntrophic coculture. *Environ. Microbiol.* **2017**, *19*, 2727–2739, doi:10.1111/1462-2920.13774.
59. Kelly, W.J.; Leahy, S.C.; Li, D.; Perry, R.; Lambie, S.C.; Attwood, G.T.; Altermann, E. The complete genome sequence of the rumen methanogen *Methanobacterium formicicum* BRM9. *Stand. Genomic Sci.* **2014**, *9*, 1–8, doi:10.1186/1944-3277-9-15.
60. Zhang, W.; Zhang, F.; Li, Y.-X.; Jiang, Y.; Zeng, R.J. No difference in inhibition among free acids of acetate, propionate and butyrate on hydrogenotrophic methanogen of *Methanobacterium formicicum*. *Bioresour. Technol.* **2019**, *294*, 122237, doi:10.1016/j.biortech.2019.122237.
61. Battumur, U.; Yoon, Y.-M.; Kim, C.-H. Isolation and Characterization of a New *Methanobacterium formicicum* KOR-1 from an Anaerobic Digester Using Pig Slurry. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* **2016**, *29*, 586–593, doi:10.5713/ajas.15.0507.
62. Schauer, N.L.; Ferry, J.G. Metabolism of formate in *Methanobacterium formicicum*. *J. Bacteriol.* **1980**, *142*, 800–807, doi:10.1128/jb.142.3.800-807.1980.
63. Chua, H.B.; Robinson, J.P. Formate-limited growth of *Methanobacterium formicicum* in steady-state cultures. *Arch. Microbiol.* **1983**, *135*, 158–160, doi:10.1007/BF00408027.
64. Schauer, N.L.; Ferry, J.G. Metabolism of formate in *Methanobacterium formicicum*. *J. Bacteriol.* **1980**, *142*, 800–807, doi:10.1128/jb.142.3.800-807.1980.
65. Scherer, P.; Klocke, M.; Krakat, N. Anaerobic digestion of beet silage by non-aceticlastic methanogenesis. *Conference Proceedings of the 4th International Symposium on Anaerobic Digestion of Solid Waste* **2005**, Januar, 1–7.

66. Dzofou Ngoumelah, D.; Heggeset, T.M.B.; Haugen, T.; Sulheim, S.; Wentzel, A.; Harnisch, F.; Kretzschmar, J. Effect of model methanogens on the electrochemical activity, stability, and microbial community structure of *Geobacter spp.* dominated biofilm anodes. *NPJ Biofilms Microbiomes* **2024**, *10*, 1–13, doi:10.1038/s41522-024-00490-z.
67. Jones, W.J.; Paynter, M.J.B.; Gupta, R. Characterization of *Methanococcus maripaludis* sp. nov., a new methanogen isolated from salt marsh sediment. *Arch. Microbiol.* **1983**, *135*, 91–97, doi:10.1007/BF00408015.
68. Enzmann, F.; Holtmann, D. Rational Scale-Up of a methane producing bioelectrochemical reactor to 50 L pilot scale. *Chemical Engineering Science* **2019**, *207*, 1148–1158, doi:10.1016/j.ces.2019.07.051.
69. Mayer, F.; Sabel-Becker, B.; Holtmann, D. Enhanced Electron Uptake and Methane Production by Corrosive Methanogens during Electromethanogenesis. *Microorganisms* **2022**, *10*, 2237, doi:10.3390/microorganisms10112237.
70. Yee, M.O.; Deutzmann, J.S.; Spormann, A.; Rotaru, A.-E. Cultivating electroactive microbes - from field to bench. *Nanotechnology* **2020**, doi:10.1088/1361-6528/ab6ab5.
71. Aiyer, K.S. How does electron transfer occur in microbial fuel cells? *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *36*, 19, doi:10.1007/s11274-020-2801-z.
72. Karthikeyan, R.; Singh, R.; Bose, A. Microbial electron uptake in microbial electrosynthesis: a mini-review. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *46*, 1419–1426, doi:10.1007/s10295-019-02166-6.
73. *Microbial Electrochemical and Fuel Cells: Fundamentals and Applications*; Scott, K.; Yu, E.H., Eds.; Elsevier Science: Amsterdam, Boston, Cambridge, Heidelberg, London, 2015, ISBN 978-1-78242-375-1.
74. Nath, D.; Chakraborty, I.; Ghangrekar, M.M. Methanogenesis inhibitors used in bioelectrochemical systems: A review revealing reality to decide future direction and applications. *Bioresour. Technol.* **2021**, *319*, 1–13, doi:10.1016/j.biortech.2020.124141.
75. Clifford, E.R.; Bradley, R.W.; Wey, L.T.; Lawrence, J.M.; Chen, X.; Howe, C.J.; Zhang, J.Z. Phenazines as model low-midpoint potential electron shuttles for photosynthetic bioelectrochemical systems. *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 3328–3338, doi:10.1039/d0sc05655c.
76. Omidi, M.; Mashkour, M.; Biswas, J.K.; Garlapati, V.K.; Singh, L.; Rahimnejad, M.; Pant, D. From Electricity to Products: Recent Updates on Microbial Electrosynthesis (MES). *Top Catal* **2021**, doi:10.1007/s11244-021-01503-3.

77. Barbosa, S.G.; Peixoto, L.; Alves, J.I.; Alves, M.M. Bioelectrochemical systems (BESs) towards conversion of carbon monoxide/syngas: A mini-review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2021**, *135*, 1–10, doi:10.1016/j.rser.2020.110358.
78. Gemünde, A.; Lai, B.; Pause, L.; Krömer, J.; Holtmann, D. Redox mediators in microbial electrochemical systems. *ChemElectroChem* **2022**, doi:10.1002/celec.202200216.
79. Schröder, U.; Harnisch, F.; Angenent, L.T. Microbial electrochemistry and technology: Terminology and classification. *Energy Environ. Sci.* **2015**, *8*, 513–519, doi:10.1039/C4EE03359K.
80. Mohan, S.V.; Sravan, J.S.; Butti, S.K.; Krishna, K.V.; Modestra, J.A.; Velvizhi, G.; Kumar, A.N.; Varjani, S.; Pandey, A. *Microbial Electrochemical Technology: Emerging and Sustainable Platform*; Microbial Electrochemical Technology, 2019.
81. Enzmann, F.; Mayer, F.; Holtmann, D. Process parameters influence the extracellular electron transfer mechanism in bioelectromethanogenesis. *International Journal of Hydrogen Energy* **2019**, *44*, 24450–24458, doi:10.1016/j.ijhydene.2019.07.039.
82. Harnisch, F.; Rosa, L.F.M.; Kracke, F.; Viridis, B.; Krömer, J.O. Electrifying white biotechnology: engineering and economic potential of electricity-driven bio-production. *ChemSusChem* **2015**, *8*, 758–766, doi:10.1002/cssc.201402736.
83. Enzmann, F.; Mayer, F.; Stöckl, M.; Mangold, K.-M.; Hommel, R.; Holtmann, D. Transferring bioelectrochemical processes from H-cells to a scalable bubble column reactor. *Chemical Engineering Science* **2019**, *193*, 133–143, doi:10.1016/j.ces.2018.08.056.
84. Pawar, A.; Karthic, A.; Lee, S.; Pandit, S.; Jung, S.P. Microbial electrolysis cells for electromethanogenesis: Materials, configurations and operations. *Environmental Engineering Research* **2021**, *27*, 200484-0, doi:10.4491/eer.2020.484.
85. Berger, C.; Rosenbaum, M.A. Spontaneous quorum sensing mutation modulates electroactivity of *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Bioelectrochemistry* **2017**, *117*, 1–8, doi:10.1016/j.bioelechem.2017.04.006.
86. Zhen, G.; Kobayashi, T.; Lu, X.; Xu, K. Understanding methane bioelectrosynthesis from carbon dioxide in a two-chamber microbial electrolysis cells (MECs) containing a carbon biocathode. *Bioresour. Technol.* **2015**, *186*, 141–148, doi:10.1016/j.biortech.2015.03.064.
87. Schlager, S.; Haberbauer, M.; Fuchsbauer, A.; Hemmelmair, C.; Dumitru, L.M.; Hinterberger, G.; Neugebauer, H.; Sariciftci, N.S. Bio-Electrocatalytic Application of Microorganisms for Carbon Dioxide Reduction to Methane. *ChemSusChem* **2017**, *10*, 226–233, doi:10.1002/cssc.201600963.

88. Horváth-Gönczi, N.N.; Bagi, Z.; Szuhaj, M.; Rákhely, G.; Kovács, K.L. Bioelectrochemical Systems (BES) for Biomethane Production—Review. *Fermentation* **2023**, *9*, 610, doi:10.3390/fermentation9070610.
89. Krieg, T.; Madjarov, J.; Rosa, L.F.M.; Enzmann, F.; Harnisch, F.; Holtmann, D.; Rabaey, K. Reactors for Microbial Electrobiotechnology. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2019**, *167*, 231–271, doi:10.1007/10_2017_40.
90. Beese-Vasbender, P.F.; Grote, J.-P.; Garrelfs, J.; Stratmann, M.; Mayrhofer, K.J.J. Selective microbial electrosynthesis of methane by a pure culture of a marine lithoautotrophic archaeon. *Bioelectrochemistry* **2015**, *102*, 50–55, doi:10.1016/j.bioelechem.2014.11.004.
91. Boto, S.T.; Bardl, B.; Harnisch, F.; Rosenbaum, M.A. Microbial electrosynthesis with *Clostridium ljungdahlii* benefits from hydrogen electron mediation and permits a greater variety of products. *Green Chem.* **2023**, doi:10.1039/D3GC00471F.
92. Deutzmann, J.S.; Kracke, F.; Spormann, A.M. Microbial electromethanogenesis powered by curtailed renewable electricity. *Cell Reports Physical Science* **2023**, *4*, 101515, doi:10.1016/j.xcrp.2023.101515.
93. Hengsbach, J.-N.; Sabel-Becker, B.; Ulber, R.; Holtmann, D. Microbial electrosynthesis of methane and acetate-comparison of pure and mixed cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2022**, doi:10.1007/s00253-022-12031-9.
94. Bard, A.J.; Faulkner, L.R. *Electrochemical methods: Fundamentals and applications*, 2. ed.; Wiley: Hoboken, NJ, 2001, ISBN 978-0-471-04372-0.
95. Rifi, M.R.; Covitz, F.H. *Introduction to organic electrochemistry: Techniques and Application on Organic Synthesis*; Marcel Dekker Inc: New York, 1974, ISBN 0-8247-6063-8.
96. Liang, T.; Zhou, L.; Irfan, M.; Bai, Y.; Liu, X.-Z.; Zhang, J.-L.; Wu, Z.-Y.; Wang, W.-Z.; Liu, J.-F.; Cheng, L.; et al. Assessment of Five Electron Shuttling Molecules in Extracellular Electron Transfer of Electromethanogenesis by *Methanosarcina barkeri*. *ChemElectroChem* **2020**, doi:10.1002/celc.202000918.
97. Liu, H.; Cheng, S.; Logan, B.E. Power Generation in Fed-Batch Microbial Fuel Cells as a Function of Ionic Strength, Temperature, and Reactor Configuration. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 5488–5493, doi:10.1021/es050316c.
98. Schalenbach, M.; Hoefner, T.; Paciok, P.; Carmo, M.; Lueke, W.; Stolten, D. Gas Permeation through Nafion. Part 1: Measurements. *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119*, 25145–25155, doi:10.1021/acs.jpcc.5b04155.

99. Mukaddam, M.; Litwiller, E.; Pinnau, I. Gas Sorption, Diffusion, and Permeation in Nafion. *Macromolecules* **2016**, *49*, 280–286, doi:10.1021/acs.macromol.5b02578.
100. Zeppilli, M.; Paiano, P.; Torres, C.; Pant, D. A critical evaluation of the pH split and associated effects in bioelectrochemical processes. *Chemical Engineering Journal* **2021**, *422*, 1–12, doi:10.1016/j.cej.2021.130155.
101. La Puentea, C. de; Carrillo-Peña, D.; Pelaza, G.; Morána, A.; Mateosa, R. Microbial electrosynthesis for CO₂ conversion and methane production: Influence of electrode geometry on biofilm development. *Greenhouse Gases* **2022**, doi:10.1002/ghg.2185.
102. Baek, G.; Rossi, R.; Saikaly, P.E.; Logan, B.E. High-rate microbial electrosynthesis using a zero-gap flow cell and vapor-fed anode design. *Water Res.* **2022**, *219*, 1–9, doi:10.1016/j.watres.2022.118597.
103. Gao, T.; Zhang, H.; Xu, X.; Teng, J. Mutual effects of CO₂ absorption and H₂-mediated electromethanogenesis triggering efficient biogas upgrading. *Sci. Total Environ.* **2022**, *818*, 1–9, doi:10.1016/j.scitotenv.2021.151732.
104. Krieg, T.; Phan, L.M.P.; Wood, J.A.; Sydow, A.; Vassilev, I.; Krömer, J.O.; Mangold, K.-M.; Holtmann, D. Characterization of a membrane-separated and a membrane-less electrobioreactor for bioelectrochemical syntheses. *Biotechnol. Bioeng.* **2018**, *115*, 1705–1716, doi:10.1002/bit.26600.
105. Nelson, D.L.; Cox, M.M. *Lehninger Biochemie*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2001, ISBN 978-3-662-08290-4.
106. Li, S.; Song, Y.E.; Baek, J.; Im, H.S.; Sakuntala, M.; Kim, M.; Park, C.; Min, B.; Kim, J.R. Bioelectrosynthetic Conversion of CO₂ Using Different Redox Mediators: Electron and Carbon Balances in a Bioelectrochemical System. *Energies* **2020**, *13*, 2572, doi:10.3390/en13102572.
107. Lee, B.; Park, J.-G.; Shin, W.-B.; Tian, D.-J.; Jun, H.-B. Microbial communities change in an anaerobic digestion after application of microbial electrolysis cells. *Bioresour. Technol.* **2017**, *234*, 273–280, doi:10.1016/j.biortech.2017.02.022.
108. Babanova, S.; Carpenter, K.; Phadke, S.; Suzuki, S.; Ishii, S.; Phan, T.; Grossi-Soyster, E.; Flynn, M.; Hogan, J.; Bretschger, O. The Effect of Membrane Type on the Performance of Microbial Electrosynthesis Cells for Methane Production. *J. Electrochem. Soc.* **2017**, *164*, H3015-H3023, doi:10.1149/2.0051703jes.
109. Harnisch, F.; Freguia, S. A basic tutorial on cyclic voltammetry for the investigation of electroactive microbial biofilms. *Chem. Asian J.* **2012**, *7*, 466–475, doi:10.1002/asia.201100740.

110. McNaught, A.D.; Wilkinson A. *Compendium of Chemical Terminology: Gold Book*, 2nd ed.; Wiley, 1997, ISBN 0865426848.
111. Bosire, E.M.; Rosenbaum, M.A. Electrochemical Potential Influences Phenazine Production, Electron Transfer and Consequently Electric Current Generation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 892, doi:10.3389/fmicb.2017.00892.
112. Naderi, A.; Kakavandi, B.; Giannakis, S.; Angelidaki, I.; Rezaei Kalantary, R. Putting the electro-bugs to work: A systematic review of 22 years of advances in bio-electrochemical systems and the parameters governing their performance. *Environ. Res.* **2023**, *229*, 1–30, doi:10.1016/j.envres.2023.115843.
113. Wang, X.; Cheng, S.; Feng, Y.; Merrill, M.D.; Saito, T.; Logan, B.E. Use of carbon mesh anodes and the effect of different pretreatment methods on power production in microbial fuel cells. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43*, 6870–6874, doi:10.1021/es900997w.
114. Marken, F.; Neudeck, A.; Bond, A.M. Cyclic Voltammetry. In *Electroanalytical Methods*; Scholz, F., Bond, A., Compton, R., Fiedler, D., Inzelt, G., Kahlert, H., Komorsky-Lovrić, Š., Lohse, H., Lovrić, M., Marken, F., Neudeck, A., Retter, U., Scholz, F., Stojek, Z., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2010**; pp 57–106, ISBN 978-3-642-02914-1.
115. *Principles of instrumental analysis*; Skoog, D.A.; Holler, F.J.; Crouch, S.R., Eds., Internat. student ed., 6. ed.; Thomson [u.a.]: Belmont, CA, 2007, ISBN 0495012017.
116. Wang, W.; Wei, X.; Choi, D.; Lu, X.; Yang, G.; Sun, C. Electrochemical cells for medium- and large-scale energy storage. In *Advances in batteries for large- and medium-scale energy storage: Applications in power systems and electric vehicles*; Menictas, C., Ed.; Woodhead Publishing: Oxford, **2014**; pp 3–28, ISBN 9781782420132.
117. Lettenmeier, P. *White paper: Wirkungsgrad – Elektrolyse*, Erlangen, **2019**.
118. Smolinka, T.; Günther, M.; Garche, J. *NOW-Studie „Stand und Entwicklungspotenzial der Wasserelektrolyse zur Herstellung von Wasserstoff aus regenerativen Energien“: Kurzfassung des Abschlussberichts*, **2010**.
119. Clauwaert, P.; Verstraete, W. Methanogenesis in membraneless microbial electrolysis cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *82*, 829–836, doi:10.1007/s00253-008-1796-4.
120. Villano, M.; Monaco, G.; Aulenta, F.; Majone, M. Electrochemically assisted methane production in a biofilm reactor. *Journal of Power Sources* **2011**, *196*, 9467–9472, doi:10.1016/j.jpowsour.2011.07.016.

121. Villano, M.; Aulenta, F.; Ciucci, C.; Ferri, T.; Giuliano, A.; Majone, M. Bioelectrochemical reduction of CO₂ to CH₄ via direct and indirect extracellular electron transfer by a hydrogenophilic methanogenic culture. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 3085–3090, doi:10.1016/j.biortech.2009.12.077.
122. Lohner, S.T.; Deutzmann, J.S.; Logan, B.E.; Leigh, J.; Spormann, A.M. Hydrogenase-independent uptake and metabolism of electrons by the archaeon *Methanococcus maripaludis*. *ISME J.* **2014**, *8*, 1673–1681, doi:10.1038/ismej.2014.82.
123. Aulenta, F.; Tocca, L.; Verdini, R.; Reale, P.; Majone, M. Dechlorination of trichloroethene in a continuous-flow bioelectrochemical reactor: effect of cathode potential on rate, selectivity, and electron transfer mechanisms. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45*, 8444–8451, doi:10.1021/es202262y.
124. Blanchet, E.; Duquenne, F.; Rafrafi, Y.; Etcheverry, L.; Erable, B.; Bergel, A. Importance of the hydrogen route in up-scaling electrosynthesis for microbial CO₂ reduction. *Energy Environ. Sci.* **2015**, *8*, 3731–3744, doi:10.1039/C5EE03088A.
125. Fuchs, G.; Moll, J.; Scherer, P.; Thauer R. Activity, Acceptor specificity and Function of dehydrogenase in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Hydrogenase: Thier Catalytic Activity, Structure and Function, Verlag Erich Goltze KG, Göttingen* **1978**, 83–92.
126. Scherer, P. Medium design for mass cultivation of methylotrophic methanogens: optima curves for gas evolution rates and growth yields of some new, precisely dosable inorganic and organic sulfur sources in comparison with H₂S. *Dechema Biotechnology Conferences 1 - VCH Verlagsgesellschaft* **1989**, 447–456.
127. Scherer, P.; Kneifel, H. Distribution of polyamines in methanogenic bacteria. *J. Bacteriol.* **1983**, *154*, 1315–1322, doi:10.1128/jb.154.3.1315-1322.1983.
128. Nazari, S.; Zinatizadeh, A.A.; Mirghorayshi, M.; van Loosdrecht, M.C.M. Waste or Gold? Bioelectrochemical Resource Recovery in Source-Separated Urine. *Trends Biotechnol.* **2020**, doi:10.1016/j.tibtech.2020.03.007.
129. Sambrook, J.; Russell, D.W. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, N.Y, 2001, ISBN 0879695773.
130. Anderson, Kevin L. and Fung, Daniel Y. C. Anaerobic Methods, Techniques and Principles for Food Bacteriology: A Review. *Journal of Food Protection* **1983**, *46*, 811–822.
131. Katsuki Adachi. Isolation of hydrogenotrophic methanogenic archaea from a subtropical paddy field. *FEMS Microbiology Ecology* **1999**, *30*, 77–85.

132. Wu, S.-Y.; Lai, M.-C. Methanogenic archaea isolated from Taiwan's Chelungpu fault. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 830–838, doi:10.1128/AEM.01539-10.
133. Zandt, M.H. in ; van den Bosch, T.J.M.; Rijkers, R.; van Kessel, M.A.H.J.; Jetten, M.S.M.; Welte, C.U. Co-cultivation of the strictly anaerobic methanogen *Methanosarcina barkeri* with aerobic methanotrophs in an oxygen-limited membrane bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102*, 5685–5694, doi:10.1007/s00253-018-9038-x.
134. Kotelnikova, S.; Macario, A.J.; Pedersen, K. *Methanobacterium subterraneum* sp. nov., a new alkaliphilic, eurythermic and halotolerant methanogen isolated from deep granitic groundwater. *International Journal of Systematic Bacteriology* **1998**, *48 Pt 2*, 357–367, doi:10.1099/00207713-48-2-357.
135. Maus, I.; Koeck, D.E.; Cibis, K.G.; Hahnke, S.; Kim, Y.S.; Langer, T.; Kreubel, J.; Erhard, M.; Bremges, A.; Off, S.; et al. Unraveling the microbiome of a thermophilic biogas plant by metagenome and metatranscriptome analysis complemented by characterization of bacterial and archaeal isolates. *Biotechnol. Biofuels* **2016**, *9*, 171, doi:10.1186/s13068-016-0581-3.
136. Dou, Z.; Dykstra, C.M.; Pavlostathis, S.G. Bioelectrochemically assisted anaerobic digestion system for biogas upgrading and enhanced methane production. *Sci. Total Environ.* **2018**, *633*, 1012–1021, doi:10.1016/j.scitotenv.2018.03.255.
137. Batlle-Vilanova, P.; Puig, S.; Gonzalez-Olmos, R.; Vilajeliu-Pons, A.; Balaguer, M.D.; Colprim, J. Deciphering the electron transfer mechanisms for biogas upgrading to biomethane within a mixed culture biocathode. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 52243–52251, doi:10.1039/C5RA09039C.
138. Call, D.F.; Logan, B.E. A method for high throughput bioelectrochemical research based on small scale microbial electrolysis cells. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26*, 4526–4531, doi:10.1016/j.bios.2011.05.014.
139. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*; Stackebrandt, E., Ed.; Wiley: Chichester, **1991**, ISBN 0471929069.
140. Gantner, S.; Andersson, A.F.; Alonso-Sáez, L.; Bertilsson, S. Novel primers for 16S rRNA-based archaeal community analyses in environmental samples. *J. Microbiol. Methods* **2011**, *84*, 12–18, doi:10.1016/j.mimet.2010.10.001.
141. Tokura, M.; Chagan, I.; Ushida, K.; Kojima, Y. Phylogenetic study of methanogens associated with rumen ciliates. *Curr. Microbiol.* **1999**, *39*, 123–128, doi:10.1007/s002849900432.

142. Nettmann, E.; Bergmann, I.; Mundt, K.; Linke, B.; Klocke, M. Archaea diversity within a commercial biogas plant utilizing herbal biomass determined by 16S rDNA and mcrA analysis. *J. Appl. Microbiol.* **2008**, *105*, 1835–1850, doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03949.x.
143. Sotres, A.; Díaz-Marcos, J.; Guivernau, M.; Illa, J.; Magrí, A.; Prenafeta-Boldú, F.X.; Bonmatí, A.; Viñas, M. Microbial community dynamics in two-chambered microbial fuel cells: effect of different ion exchange membranes. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2015**, *90*, 1497–1506, doi:10.1002/jctb.4465.
144. Kim, Y.S.; Westerholm, M.; Scherer, P. Dual investigation of methanogenic processes by quantitative PCR and quantitative microscopic fingerprinting. *FEMS Microbiol. Lett.* **2014**, *360*, 76–84, doi:10.1111/1574-6968.12592.
145. Grinter, R.; Greening, C. Cofactor F420: an expanded view of its distribution, biosynthesis and roles in bacteria and archaea. *FEMS Microbiol. Rev.* **2021**, *45*, doi:10.1093/femsre/fuab021.
146. Jia, X.; Li, M.; Wang, Y.; Wu, Y.; Zhu, L.; Wang, X.; Zhao, Y. Enhancement of hydrogen production and energy recovery through electro-fermentation from the dark fermentation effluent of food waste. *Environmental Science and Ecotechnology* **2020**, *1*, 1–11, doi:10.1016/j.ese.2019.100006.
147. Li, J.; Li, Z.; Xiao, S.; Fu, Q.; Kobayashi, H.; Zhang, L.; Liao, Q.; Zhu, X. Startup cathode potentials determine electron transfer behaviours of biocathodes catalysing CO₂ reduction to CH₄ in microbial electrosynthesis. *Journal of CO₂ Utilization* **2020**, *35*, 169–175, doi:10.1016/j.jcou.2019.09.013.
148. Jiang, B.; Yu, L.; Wu, L.; Di Mu; Le Liu; Xi, J.; Qiu, X. Insights into the Impact of the Nafion Membrane Pretreatment Process on Vanadium Flow Battery Performance. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 12228–12238, doi:10.1021/acsami.6b03529.
149. Kuwertz, R.; Kirstein, C.; Turek, T.; Kunz, U. Influence of acid pretreatment on ionic conductivity of Nafion® membranes. *Journal of Membrane Science* **2016**, *500*, 225–235, doi:10.1016/j.memsci.2015.11.022.
150. Baek, G.; Kim, J.; Lee, S.; Lee, C. Development of biocathode during repeated cycles of bioelectrochemical conversion of carbon dioxide to methane. *Bioresour. Technol.* **2017**, *241*, 1201–1207, doi:10.1016/j.biortech.2017.06.125.
151. Zakaria, B.S.; Barua, S.; Sharaf, A.; Liu, Y.; Dhar, B.R. Impact of antimicrobial silver nanoparticles on anode respiring bacteria in a microbial electrolysis cell. *Chemosphere* **2018**, *213*, 259–267, doi:10.1016/j.chemosphere.2018.09.060.

152. Tartakovsky, B.; Mehta, P.; Bourque, J.-S.; Guiot, S.R. Electrolysis-enhanced anaerobic digestion of wastewater. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 5685–5691, doi:10.1016/j.biortech.2011.02.097.
153. Bian, B.; Yu, N.; Akbari, A.; Le Shi; Zhou, X.; Xie, C.; Saikaly, P.E.; Logan, B.E. Using a non-precious metal catalyst for long-term enhancement of methane production in a zero-gap microbial electrosynthesis cell. *Water Res.* **2024**, 121815, doi:10.1016/j.watres.2024.121815.
154. Takahashi, S.; Tomita, J.; Nishioka, K.; Hisada, T.; Nishijima, M. Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of Bacteria and Archaea using next-generation sequencing. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e105592, doi:10.1371/journal.pone.0105592.
155. Hallam, S.J.; Putnam, N.; Preston, C.M.; Detter, J.C.; Rokhsar, D.; Richardson, P.M.; DeLong, E.F. Reverse methanogenesis: testing the hypothesis with environmental genomics. *Science* **2004**, *305*, 1457–1462, doi:10.1126/science.1100025.
156. Hallam, S.J.; Girguis, P.R.; Preston, C.M.; Richardson, P.M.; DeLong, E.F. Identification of methyl coenzyme M reductase A (*mcrA*) genes associated with methane-oxidizing archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 5483–5491, doi:10.1128/AEM.69.9.5483-5491.2003.
157. Schorn, S.; Ahmerkamp, S.; Bullock, E.; Weber, M.; Lott, C.; Liebeke, M.; Lavik, G.; Kuypers, M.M.M.; Graf, J.S.; Milucka, J. Diverse methylotrophic methanogenic archaea cause high methane emissions from seagrass meadows. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2022**, *119*, doi:10.1073/pnas.2106628119.
158. Xavier, K.V.M.; Souza, E.S.e.; Santos, E.d.A.; Diniz, M.C. Genetic diversity of 16S rRNA and *mcrA* genes from methanogenic archaeas. *Acta Sci. Biol. Sci.* **2020**, *42*, e49877, doi:10.4025/actascibiolsoci.v42i1.49877.
159. Hassa, J.; Maus, I.; Off, S.; Pühler, A.; Scherer, P.; Klocke, M.; Schlüter, A. Metagenome, metatranscriptome, and metaproteome approaches unraveled compositions and functional relationships of microbial communities residing in biogas plants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102*, 1–21, doi:10.1007/s00253-018-8976-7.
160. Zhang, L.; Li, C.; Ding, L.; Xu, K.; Ren, H. Influences of initial pH on performance and anodic microbes of fed-batch microbial fuel cells. *J Chem Technol Biotechnol* **2011**, *86*, 1226–1232, doi:10.1002/jctb.2641.

161. Song, T.-S.; Wang, G.; Wang, H.; Huang, Q.; Xie, J. Experimental evaluation of the influential factors of acetate production driven by a DC power system via CO₂ reduction through microbial electrosynthesis. *Bioresour. Bioprocess.* **2019**, *6*, doi:10.1186/s40643-019-0265-5.
162. Batlle-Vilanova, P.; Puig, S.; Gonzalez-Olmos, R.; Vilajeliu-Pons, A.; Bañeras, L.; Balaguer, M.D.; Colprim, J. Assessment of biotic and abiotic graphite cathodes for hydrogen production in microbial electrolysis cells. *International Journal of Hydrogen Energy* **2014**, *39*, 1297–1305, doi:10.1016/j.ijhydene.2013.11.017.
163. Fu, Q.; He, Y.; Li, Z.; Li, J.; Zhang, L.; Zhu, X.; Liao, Q. Direct CO₂ delivery with hollow stainless steel/graphene foam electrode for enhanced methane production in microbial electrosynthesis. *Energy Conversion and Management* **2022**, *268*, 1–9, doi:10.1016/j.enconman.2022.116018.
164. Xia, R.; Cheng, J.; Li, H.; Yang, X.; Ren, X.; Dong, H.; Chen, Z.; Zhou, X.; Lin, R.; Zhou, J. Dual Metal Active Sites and an Enhanced Electric Field Boosting CO₂ Reduction to CH₄ in an Electromethanogenesis System. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2022**, *10*, 2890–2902, doi:10.1021/acssuschemeng.1c07464.
165. Xiu, S.; Yao, J.; Wu, G.; Huang, Y.; Yang, B.; Huang, Y.; Lei, L.; Li, Z.; Hou, Y. Hydrogen-Mediated Electron Transfer in Hybrid Microbial–Inorganic Systems and Application in Energy and the Environment. *Energy Technol.* **2019**, doi:10.1002/ente.201800987.
166. Wang, A.; Liu, W.; Cheng, S.; Xing, D.; Zhou, J.; Logan, B.E. Source of methane and methods to control its formation in single chamber microbial electrolysis cells. *International Journal of Hydrogen Energy* **2009**, *34*, 3653–3658, doi:10.1016/j.ijhydene.2009.03.005.
167. Pelaz, G.; González, R.; Morán, A.; Escapa, A. Elucidating the impact of power interruptions on microbial electromethanogenesis. *Applied Energy* **2023**, *331*, 1–9, doi:10.1016/j.apenergy.2022.120382.
168. Logan, B.E.; Call, D.; Cheng, S.; Hamelers, H.V.M.; Sleutels, T.H.J.A.; Jeremiassen, A.W.; Rozendal, R.A. Microbial Electrolysis Cells for High Yield Hydrogen Gas Production from Organic Matter. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 8630–8640, doi:10.1021/es801553z.

169. Korth, B.; Kretzschmar, J.; Bartz, M.; Kuchenbuch, A.; Harnisch, F. Determining incremental coulombic efficiency and physiological parameters of early stage *Geobacter* spp. enrichment biofilms. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0234077, doi:10.1371/journal.pone.0234077.
170. Zakaria, B.S.; Dhar, B.R. Progress towards catalyzing electro-methanogenesis in anaerobic digestion process: Fundamentals, process optimization, design and scale-up considerations. *Bioresour. Technol.* **2019**, *289*, 121738, doi:10.1016/j.biortech.2019.121738.
171. Bakonyi, P.; Koók, L.; Rózsenszki, T.; Kalauz-Simon, V.; Bélafi-Bakó, K.; Nemestóthy, N. CO₂-refinery through microbial electrosynthesis (MES): A concise review on design, operation, biocatalysts and perspectives. *Journal of CO₂ Utilization* **2023**, *67*, 1–8, doi:10.1016/j.jcou.2022.102348.
172. Deutzmann, J.S.; Kracke, F.; Spormann, A.M. Microbial electromethanogenesis powered by curtailed renewable electricity. *Cell Reports Physical Science* **2023**, *4*, 1–16, doi:10.1016/j.xcrp.2023.101515.
173. Kracke, F.; Deutzmann, J.S.; Gu, W.; Spormann, A.M. In situ electrochemical H₂ production for efficient and stable power-to-gas electromethanogenesis. *Green Chem.* **2020**, *22*, 6194–6203, doi:10.1039/D0GC01894E.
174. Ceballos-Escalera, A.; Molognoni, D.; Bosch-Jimenez, P.; Shahparasti, M.; Bouchakour, S.; Luna, A.; Guisasola, A.; Borràs, E.; Della Pirriera, M. Bioelectrochemical systems for energy storage: A scaled-up power-to-gas approach. *Applied Energy* **2020**, *260*, 1–12, doi:10.1016/j.apenergy.2019.114138.
175. Joicy, A.; Seo, H.; Lee, M.-E.; Kim, D.-H.; Cho, S.K.; Ahn, Y. Enhanced methane production using pretreated sludge in MEC-AD system: Performance, microbial activity, and implications at different applied voltages. *International Journal of Hydrogen Energy* **2022**, *47*, 40731–40741, doi:10.1016/j.ijhydene.2022.07.154.
176. Ding, A.; Yang, Y.; Sun, G.; Wu, D. Impact of applied voltage on methane generation and microbial activities in an anaerobic microbial electrolysis cell (MEC). *Chemical Engineering Journal* **2016**, *283*, 260–265, doi:10.1016/j.cej.2015.07.054.
177. Shang, G.; Cui, K.; Cai, W.; Hu, X.; Jin, P.; Guo, K. A 20 L electrochemical continuous stirred-tank reactor for high rate microbial electrosynthesis of methane from CO₂. *Chemical Engineering Journal* **2023**, *451*, 1–8, doi:10.1016/j.cej.2022.138898.
178. Jarrell, K.F. Extreme Oxygen Sensitivity in Methanogenic Archaeobacteria. *BioScience* **1985**, *35*, 298–302, doi:10.2307/1309929.

179. Zakaria, B.S.; Ranjan Dhar, B. Intermittent energization catalyzes direct interspecies electron transfer in electro-anaerobic digestion of sewage sludge. *Chemical Engineering Journal* **2022**, *442*, 1–11, doi:10.1016/j.cej.2022.136177.
180. Yates, M.D.; Siegert, M.; Logan, B.E. Hydrogen evolution catalyzed by viable and non-viable cells on biocathodes. *International Journal of Hydrogen Energy* **2014**, *39*, 16841–16851, doi:10.1016/j.ijhydene.2014.08.015.
181. Yan, Z.; Wang, M.; Ferry, J.G. A Ferredoxin- and F₄₂₀H₂-Dependent, Electron-Bifurcating, Heterodisulfide Reductase with Homologs in the Domains Bacteria and Archaea. *MBio* **2017**, *8*, doi:10.1128/mBio.02285-16.
182. Buckel, W.; Thauer, R.K. Flavin-Based Electron Bifurcation, Ferredoxin, Flavodoxin, and Anaerobic Respiration With Protons (Ech) or NAD⁺ (Rnf) as Electron Acceptors: A Historical Review. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1–24, doi:10.3389/fmicb.2018.00401.
183. Okumus, B.; Yildiz, S.; Toprak, E. Fluidic and microfluidic tools for quantitative systems biology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2014**, *25*, 30–38, doi:10.1016/j.copbio.2013.08.016.
184. Zhang, P.; Zhang, J.; Zhang, T.; Zhang, L.; He, Y. Zero-valent iron enhanced methane production of anaerobic digestion by reinforcing microbial electron bifurcation coupled with direct inter-species electron transfer. *Water Res.* **2024**, *255*, 1–11, doi:10.1016/j.watres.2024.121428.
185. Zhang, T.; Zhang, J.; Zhang, P.; Wang, J.; He, Y. Electronic Bifurcation: A New Perspective on Fe Bio-Utilization in Anaerobic Digestion of Lactate. *Environ. Sci. Technol.* **2023**, *57*, 10448–10457, doi:10.1021/acs.est.3c01367.
186. Jourdin, L.; Sousa, J.; van Stralen, N.; Strik, D.P. Techno-economic assessment of microbial electrosynthesis from CO₂ and/or organics: An interdisciplinary roadmap towards future research and application. *Applied Energy* **2020**, *279*, 1–16, doi:10.1016/j.apenergy.2020.115775.
187. Rad, R.; Gehring, T.; Pellumbi, K.; Siegmund, D.; Nettmann, E.; Wichern, M.; Apfel, U.-P. A hybrid bioelectrochemical system coupling a zero-gap cell and a methanogenic reactor for carbon dioxide reduction using a wastewater-derived catholyte. *Cell Reports Physical Science* **2023**, *4*, 1–28, doi:10.1016/j.xcrp.2023.101526.
188. Cabau-Peinado, O.; Winkelhorst, M.; Stroek, R.; Kat Angelino, R. de; Straathof, A.; Masania, K.; Daran, J.-M.G.; Jourdin, L. Microbial Electrosynthesis from CO₂ reaches Productivity of Syngas and Chain Elongation Fermentations **2024**, doi:10.1101/2024.02.08.579422.

189. Deutzmann, J.S.; Callander, G.; Spormann, A.M. Improved reactor design enables productivity of microbial electrosynthesis on par with classical biotechnology. *Bioresour. Technol.* **2025**, *416*, 1–10, doi:10.1016/j.biortech.2024.131733.
190. Ibrahim, I.; Salehmin, M.N.I.; Balachandran, K.; Hil Me, M.F.; Loh, K.S.; Abu Bakar, M.H.; Jong, B.C.; Lim, S.S. Role of microbial electrosynthesis system in CO₂ capture and conversion: a recent advancement toward cathode development. *Front. Microbiol.* **2023**, *14*, 1192187, doi:10.3389/fmicb.2023.1192187.
191. Yu, L.; Yuan, Y.; Tang, J.; Zhou, S. Thermophilic *Moorella thermoautotrophica*-immobilized cathode enhanced microbial electrosynthesis of acetate and formate from CO₂. *Bioelectrochemistry* **2017**, *117*, 23–28, doi:10.1016/j.bioelechem.2017.05.001.

V Anhang

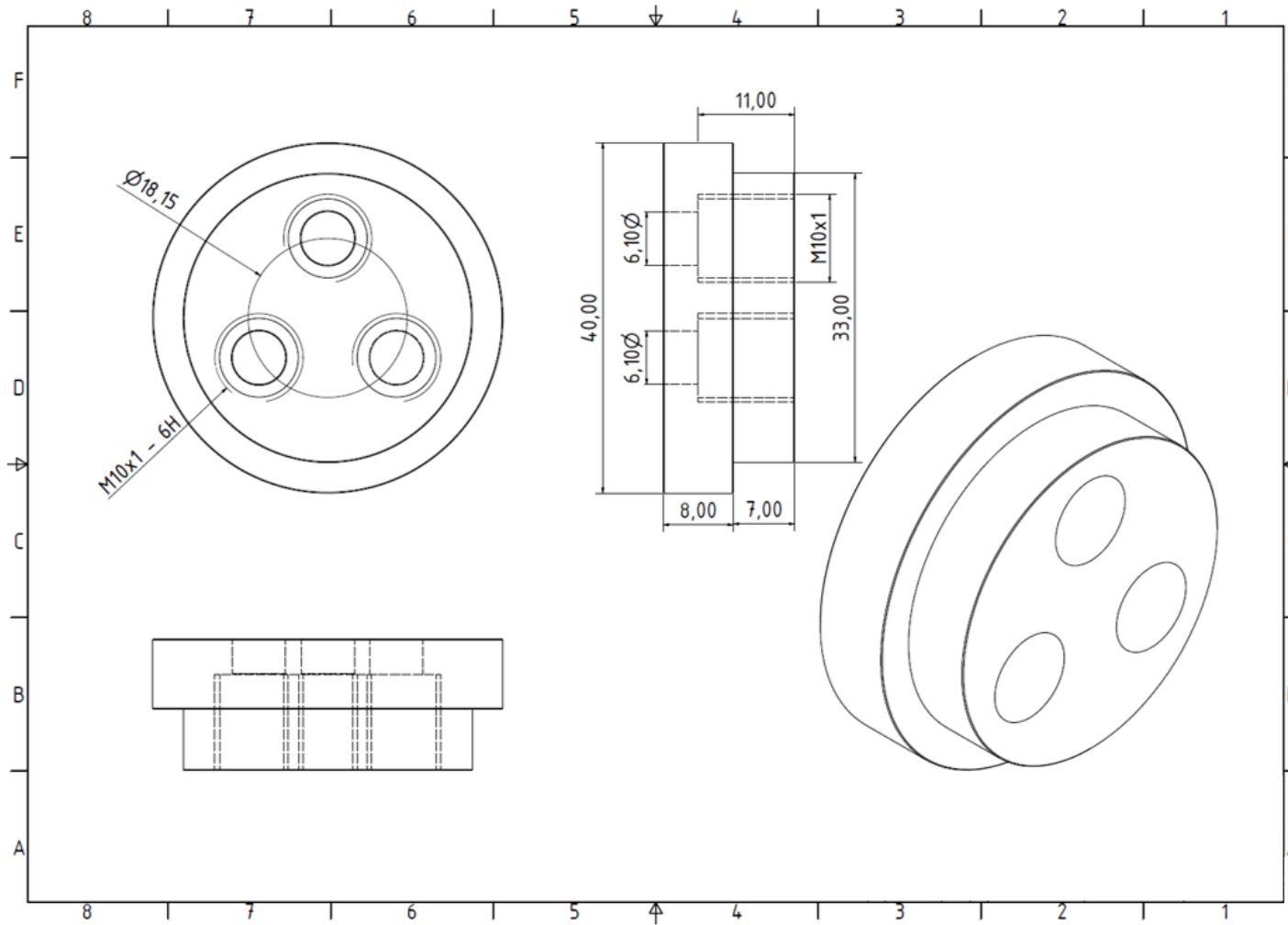


Abbildung 39 Technische Zeichnung für den Deckel der kleinen H-Zelle

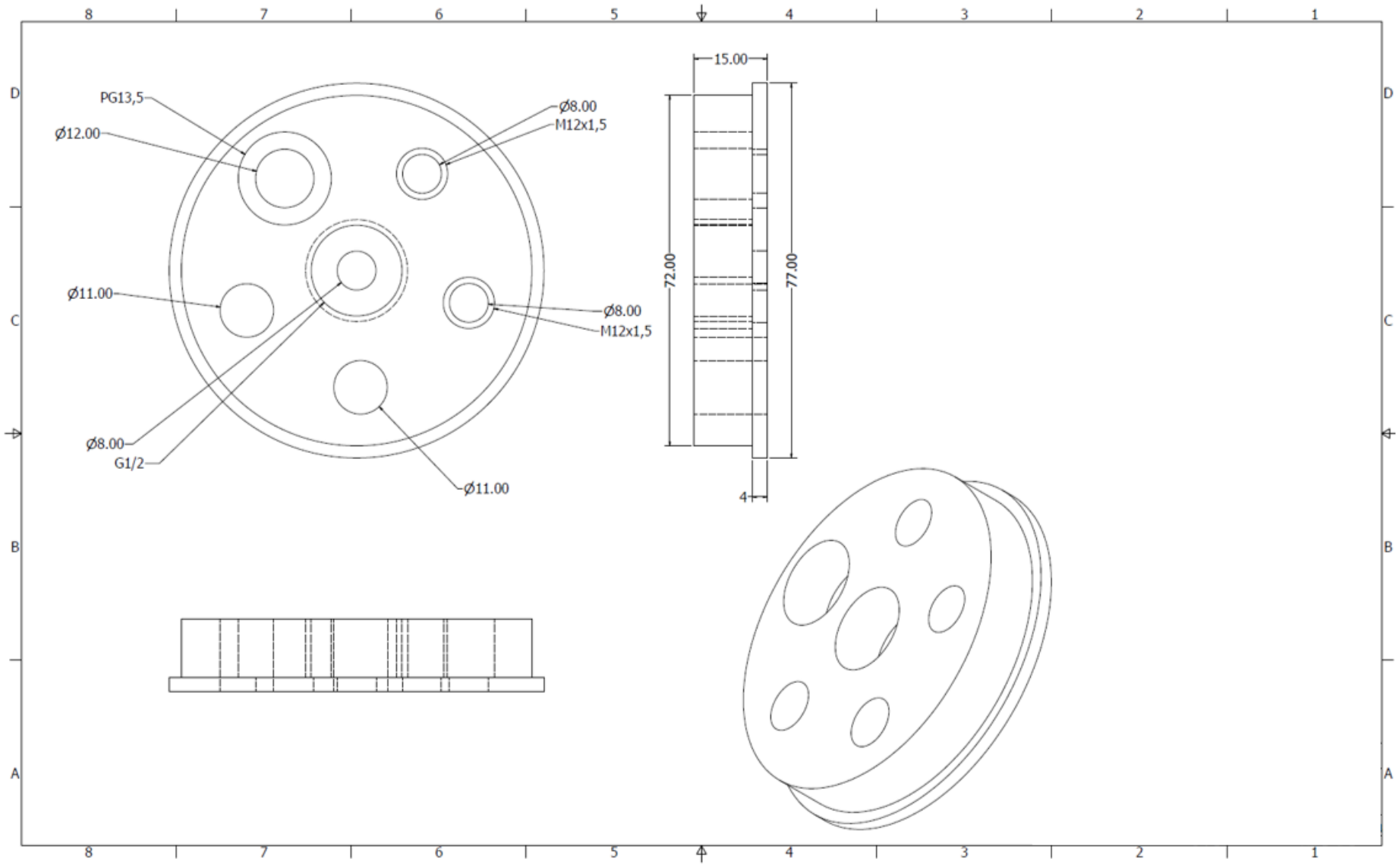


Abbildung 40 Technische Zeichnung für den Deckel der großen H-Zelle

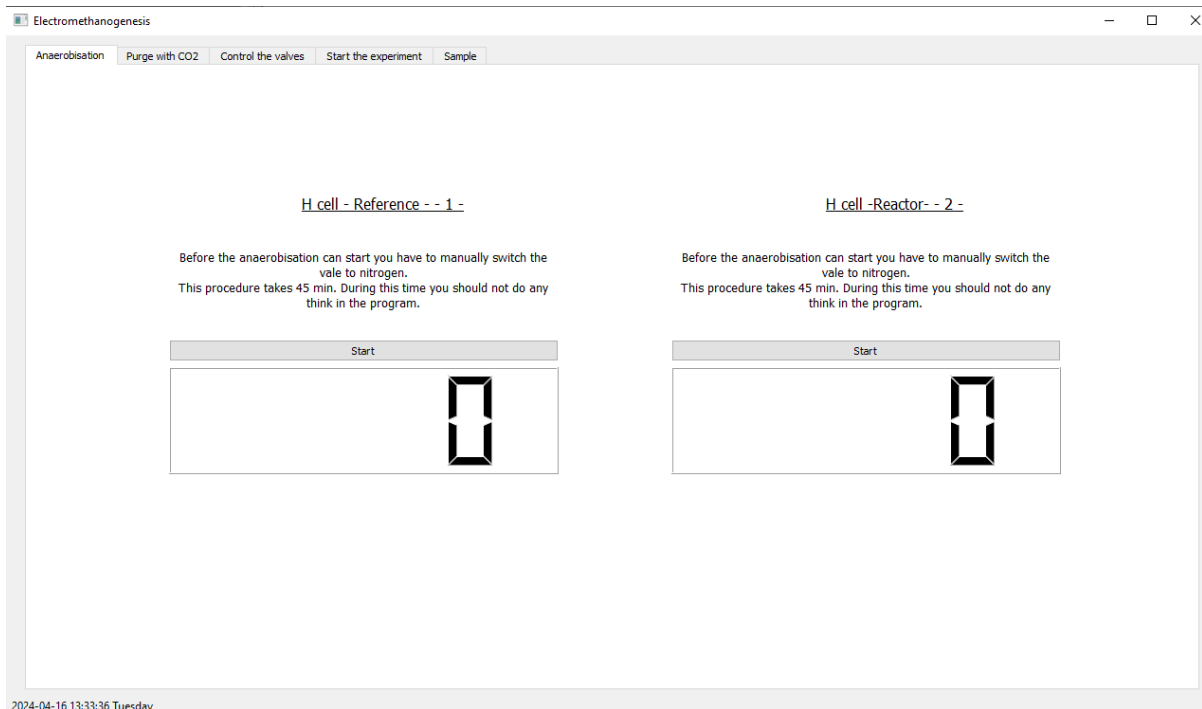


Abbildung 41 Grafische Oberfläche für die Anaerobisierung der großen H-Zelle. Beim Starten des Prozesses zum Anaerobisieren der Anoden- oder der Kathodenseite durch Klicken auf „Start“ wird ein Timer (45 min) gestartet und das Ventil zum Reaktor hin geöffnet. Nach dem Ablauf des Timers schließt sich das entsprechende Ventil automatisch

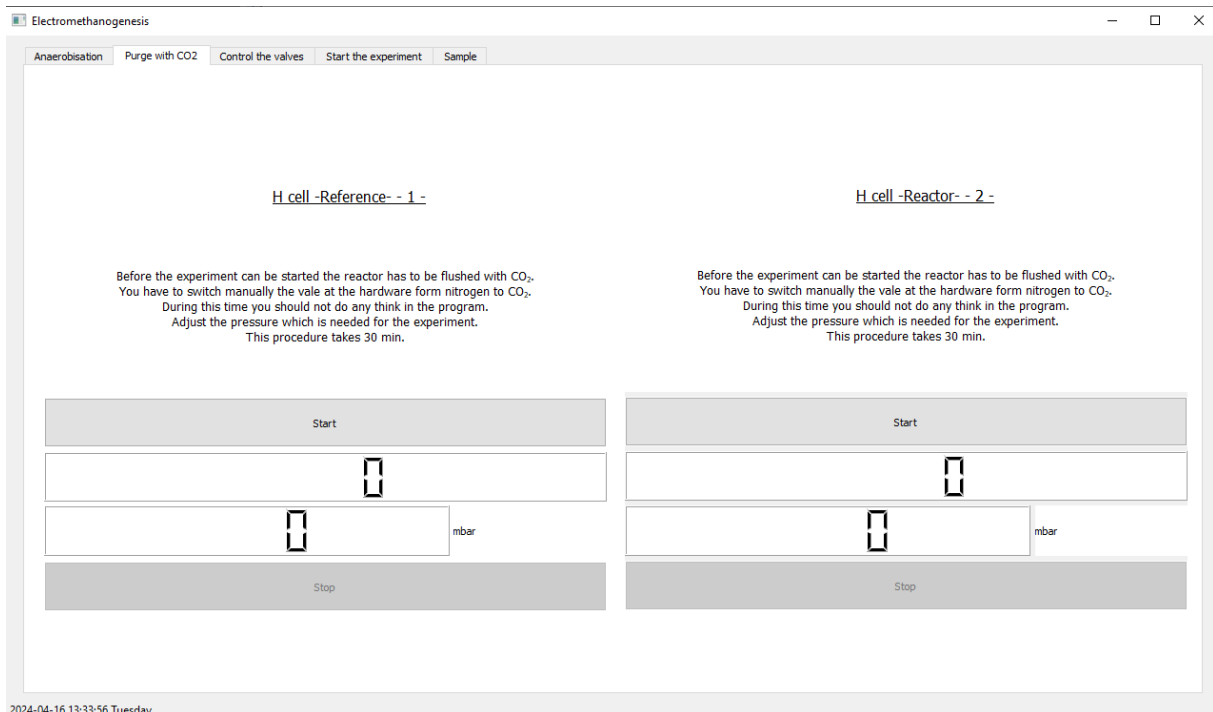


Abbildung 42 Grafische Oberfläche für das Spülen mit CO₂ und der anschließenden Druckprüfung. Gleiches Schaltungsprinzip wie in Abbildung 41. Jedoch wird zum Schluss der Druck auf einen zuvor festgelegten Druck hin überprüft und bei Bedarf nachgeregelt. Nach dem Erreichen des Druckes werden die entsprechenden Ventile geschlossen

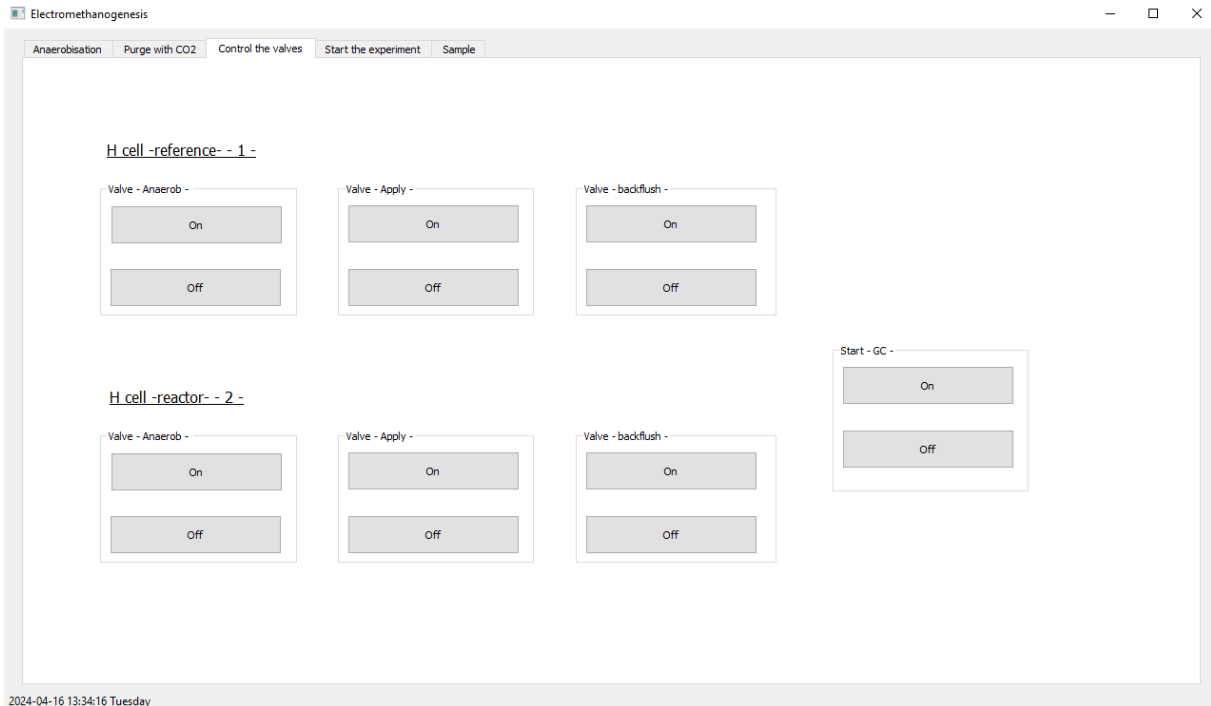


Abbildung 43 Grafische Oberfläche für die gezielte Ansteuerung der einzelnen Ventile des Steuerungsmoduls

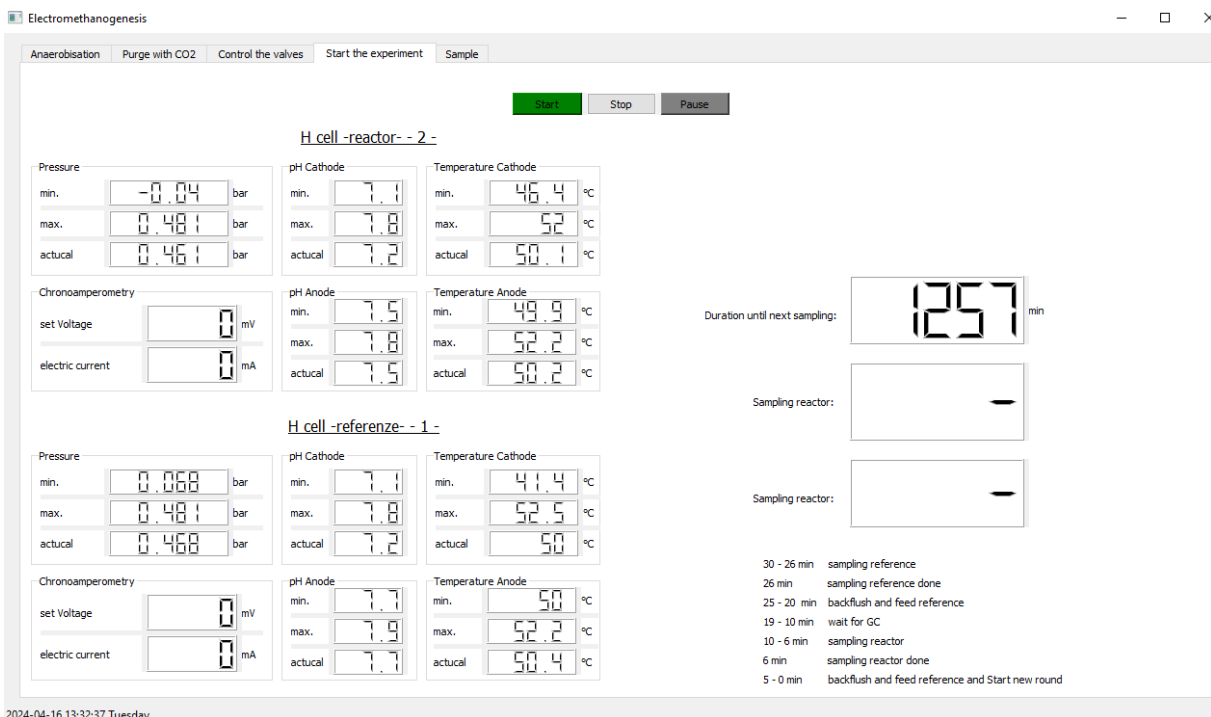


Abbildung 44 Grafische Oberfläche für die Kontrolle der einzelnen Parameter innerhalb eines Versuches für die beiden Reaktoren (Druck, pH, Temperatur). Des Weiteren wird die Dauer bis zum nächsten Messpunkt in Minuten angezeigt sowie der zeitliche Ablauf innerhalb einer Probenahme. Es wurde angedacht ebenfalls die aktuelle Stromstärke und die Spannung anzuzeigen. Jedoch verzögert diese Darstellung in Verbindung mit einer erhöhten Rechenleistung des PC den flüssigen Ablauf des Versuches

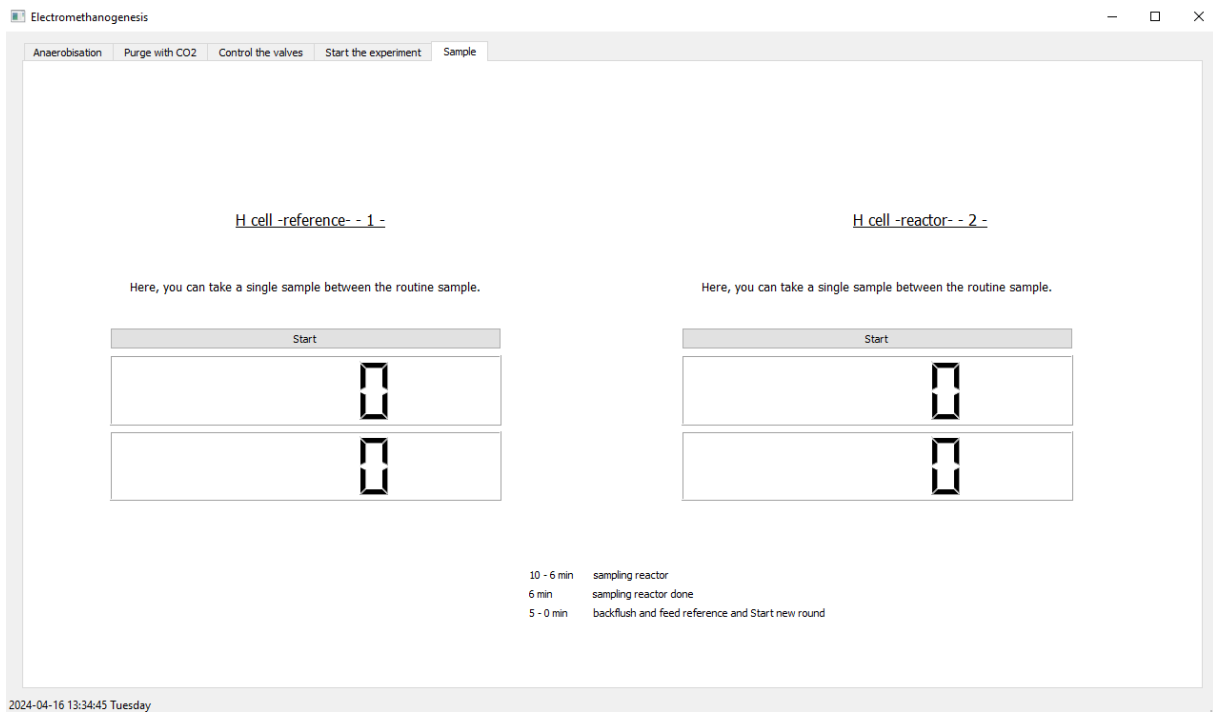


Abbildung 45 Grafische Oberfläche für eine separate Messung der Gaszusammensetzung außerhalb des vorprogrammierten Zeitintervalls

Set E_{we} to E_i =	-0.400	V	vs.	Ref	▼
Hold E_i for t_i =	0	h	0	mn	10.000 0 s
Record every dt_i =	1.000 0	s			
<hr/>					
Scan E_{we} with dE/dt =	100.000	mV/s	▼		
to vertex potential E_1 =	0.300	V	vs.	Ref	▼
Hold E_1 for t_1 =	0	h	10	mn	0.000 0 s
Record every dt_1 =	0.500 0	s			
<hr/>					
Reverse scan to vertex E_2 =	0.300	V	vs.	Ref	▼
Hold E_2 for t_2 =	0	h	0	mn	0.000 0 s
Record every dt_2 =	0.500 0	s			
<hr/>					
Measure <I> over the last	50	%	of the step duration,		
Record <I> averaged over N =	10	voltage steps			
Repeat n_C =	0	time(s)			
Record the first and every n_f =	1	cycle(s)			
<hr/>					
E Range =	-2.5 V; 2.5 V	▼	...		
	<i>Resolution = 100 μV</i>				
I Range =	Auto	▼	...		
Bandwidth =	5 - medium	▼			
<hr/>					
<input checked="" type="checkbox"/> End scan to E_f =	0.300	V	vs.	Eoc	▼
Hold E_f for t_f =	0	h	0	mn	0.000 0 s
Record every dt_f =	0.500 0	s			

Abbildung 46 Ablauf für die Herstellung einer Ag/AgCl-Elektrode nach Carola Berger Hans-Knöll-Institut, siehe Abschnitt 4.7.5 auf Seite 57

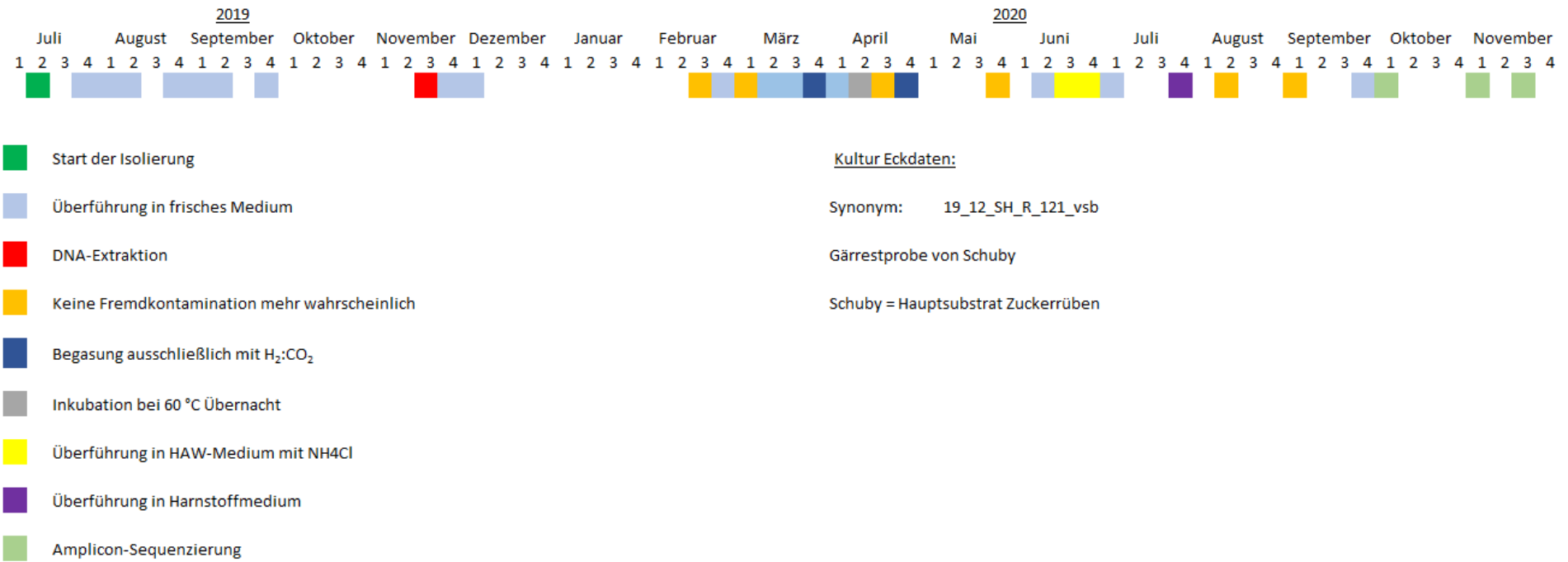


Abbildung 47 Übersicht der einzelnen Abschnitte für die Isolierung der Kultur 11

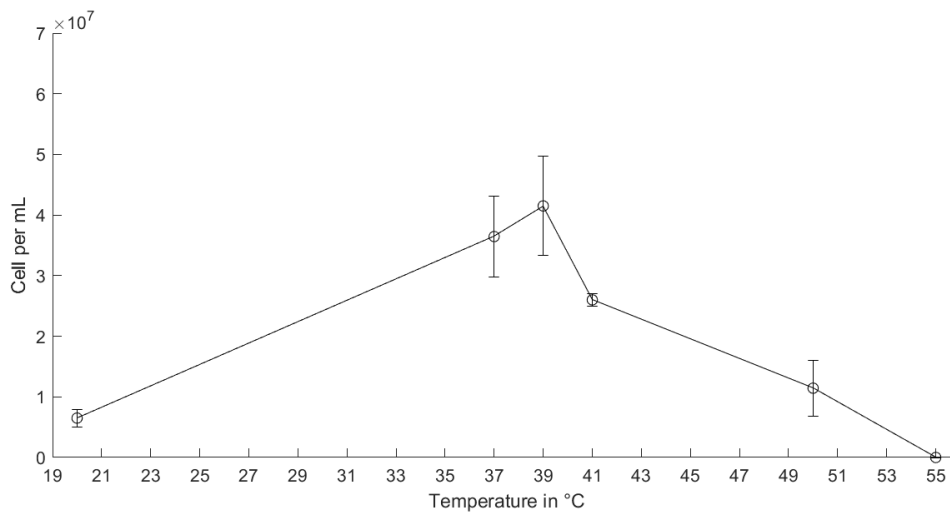


Abbildung 48 Temperaturkurve der Kultur K11

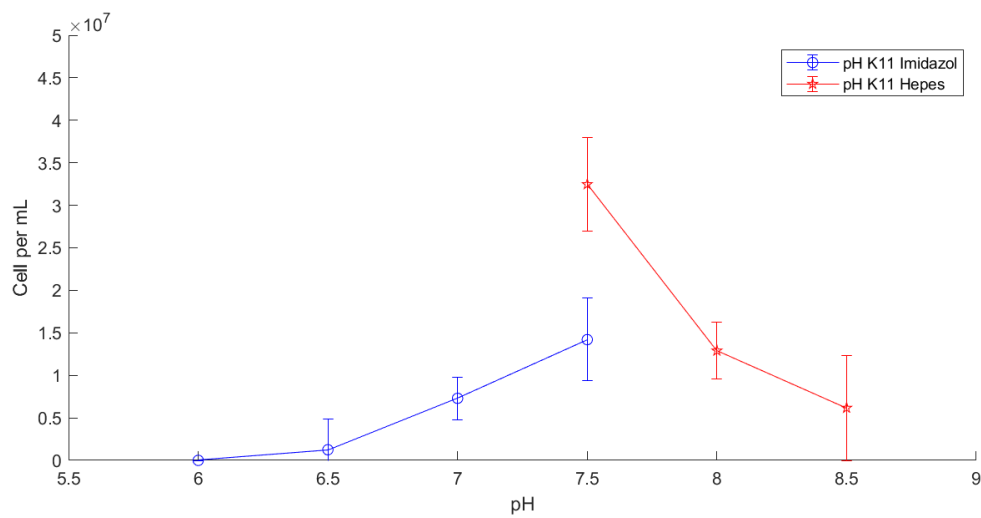


Abbildung 49 pH-Kurven der Kultur K11 unter der Verwendung der beiden Puffersysteme Imidazol (1 M) und Hepes (1 M)

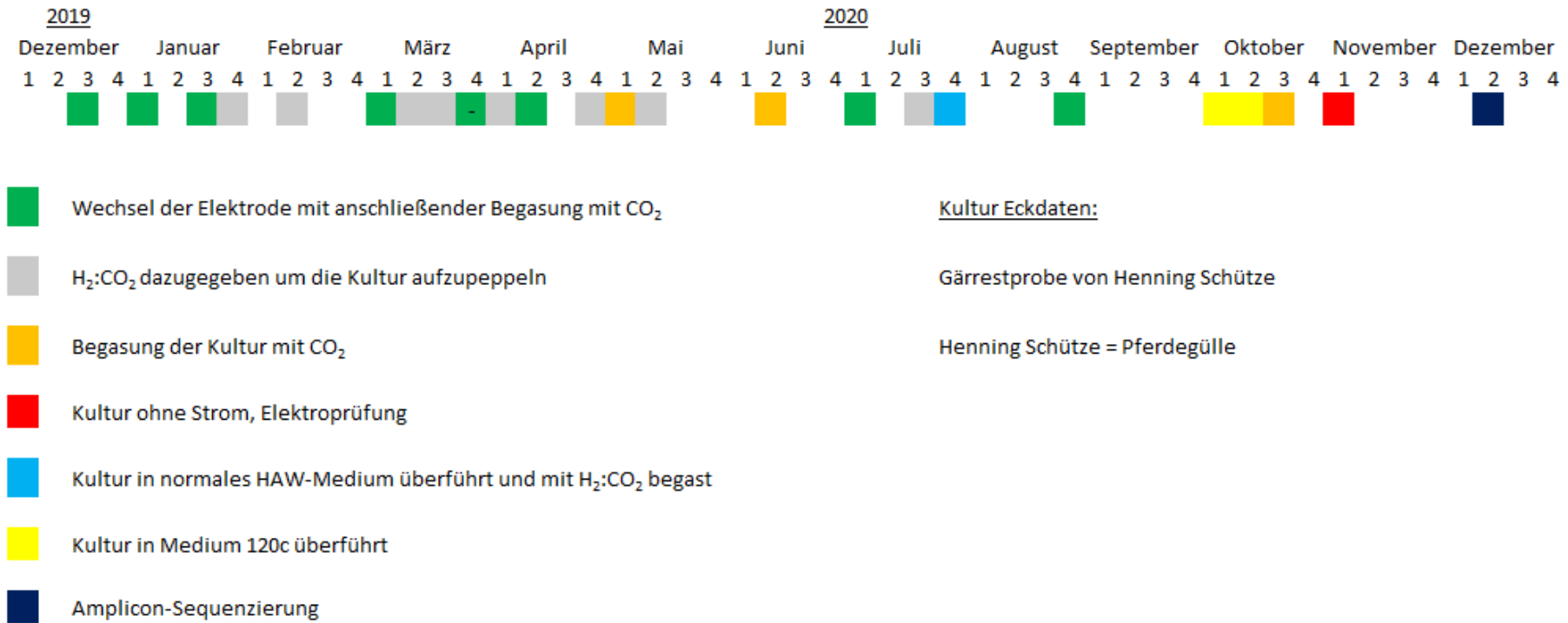


Abbildung 50 Übersicht der einzelnen Abschnitte für die Isolierung der Kultur EE via Anlegen einer Spannung

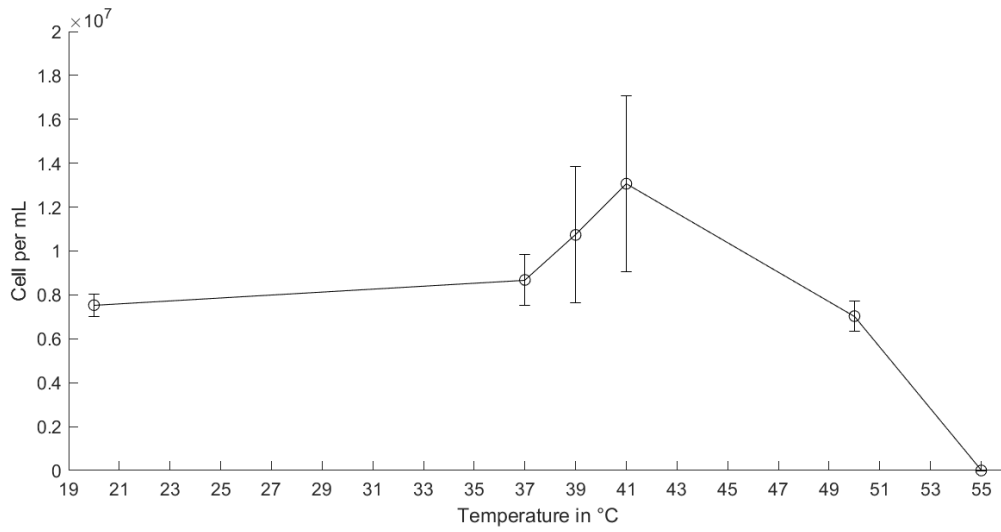


Abbildung 51 Temperaturkurve der Kultur EE

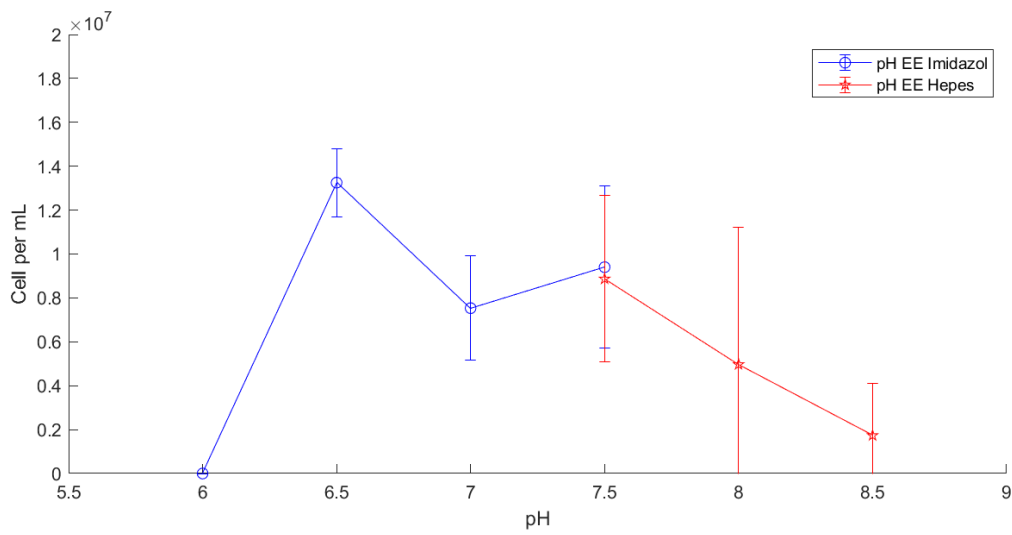


Abbildung 52 pH-Kurven der Kultur EE unter der Verwendung der beiden Puffersysteme Imidazol (1 M) und Hepes (1 M)

DNA Sequenz von der Sanger-Sequenzierung von Kultur EE

CTTCCAGGCGGTGGACTTAACAGCTTCCCTTCGGCACTGGGGCAGCTCGGAGCCATCCCA
ACACCAAGTCCACATCGTTTACGGCCAGGACTACCCGGGTATCTAATCCGGTTCGCGCCC
CTGGCTTTCGTTACTCACCGTCAGGTCCGTTCCAGTTAGCCGCCTTCGCCACAGGTGGTCC
TCCCGGGATTATAGGATTTACCCCTACCCCGGGAGTACCGCTAACCTCTCCCGGCCTCA
AGCCTAATAGTATCTCCAGCAATTCTCACGGTTAAGCCGTGAGATTTACCAGAGACTTA
TCAAGCCGGCTACGAACGCTTTAGGCCAATAAAAACGGCCACCACTTGAGCTGCCGGTG
TTACCGCGGGCGGTGGCACCAGGTCTTGCCAGCTCTTATTCCAAAAGCTTTTTACTTAA
GAAAAGCCACCCCGTTAAGAGTGGCACTTGGGTTTCCCCCGTCGCACTTTCGTGCATTGC
GGAGGTTTCGCGCCTGCTGCAACCCC

DNA Sequenz von der Sanger-Sequenzierung von Kultur EH

CCGTACTTCCAGGCGGTGGACTTAACAGCTTCCCTTCGGCACTGGGGCAGCTCGGAGCCA
TCCCAACACCAAGTCCACATCGTTTACGGCCAGGACTACCCGGGTATCTAATCCGGTTCG
CGCCCCTGGCTTTCGTTACTCACCGTCAGGTCCGTTCCAGTTAGCCGCCTTCGCCACAGGT
GGTCTCCCGGGATTATAGGATTTACCCCTACCCCGGGAGTACCGCTAACCTCTCCCGG
CCTCAAGCCTAATAGTATCTCCAGCAATTCTCACGGTTAAGCCGTGAGATTTACCAGAG
ACTTATCAAGCCGGCTACGAACGCTTTAGGCCAATAAAAACGGCCACCACTTGAGCTGC
CGGTGTTACCGCGGGCGGTGGCACCAGGTCTTGCCAGCTCTTATTCCAAAAGCTTTTTACA
CTTAAGAAAAGCCACCCCGTTAAGAGTGGCACTTGGGTTTCCCCCGTCGCACTTTCGTGC
ATTGCGGAGGTTTCGCGCCT

DNA Sequenz von der Sanger-Sequenzierung von Kultur 11

CTTCCAGGCGGTGGACTTAACAGCTTCCCTTCGGCACTGGGGCAGCTCGGAGCCATCCCA
ACACCAAGTCCACATCGTTTACGGCCAGGACTACCCGGGTATCTAATCCGGTTCGCGCCC
CTGGCTTTCGTTACTCACCGTCAGGTCCGTTCCAGTTAGCCGCCTTCGCCACAGGTGGTCC
TCCCGGGATTATAGGATTTACCCCTACCCCGGGAGTACCGCTAACCTCTCCCGGCCTCA
AGCCTAATAGTATCTCCAGCAATTCTCACGGTTAAGCCGTGAGATTTACCAGAGACTTA
TCAAGCCGGCTACGAACGCTTTAGGCCAATAAAAACGGCCACCACTTGAGCTGCCGGTG
TTACCGCGGGCGGTGGCACCAGGTCTTGCCAGCTCTTATTCCAAAAGCTTTTTACTTAA
GAAAAGCCACCCCGTTAAGAGTGGCACTTGGGTTTCCCCCGTCGCACTTTCGTGCATTGC
GGAGGTTTCGCGCCTGCTGCCCCCCCC

Zu den folgenden Abbildungen 53 bis 64:

- (A) pH (B) Leitfähigkeit mS/cm
 (C) optische Dichte bei 600 nm (D) Druck in mbar

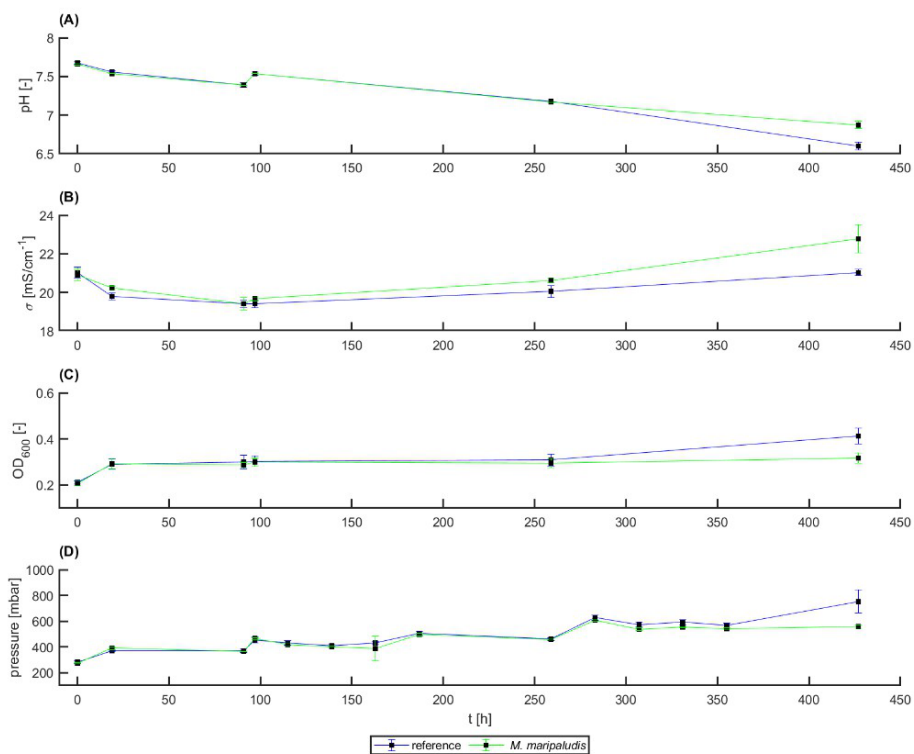


Abbildung 53 Physikochemische Daten von *Methanobacterium congolense* Anode

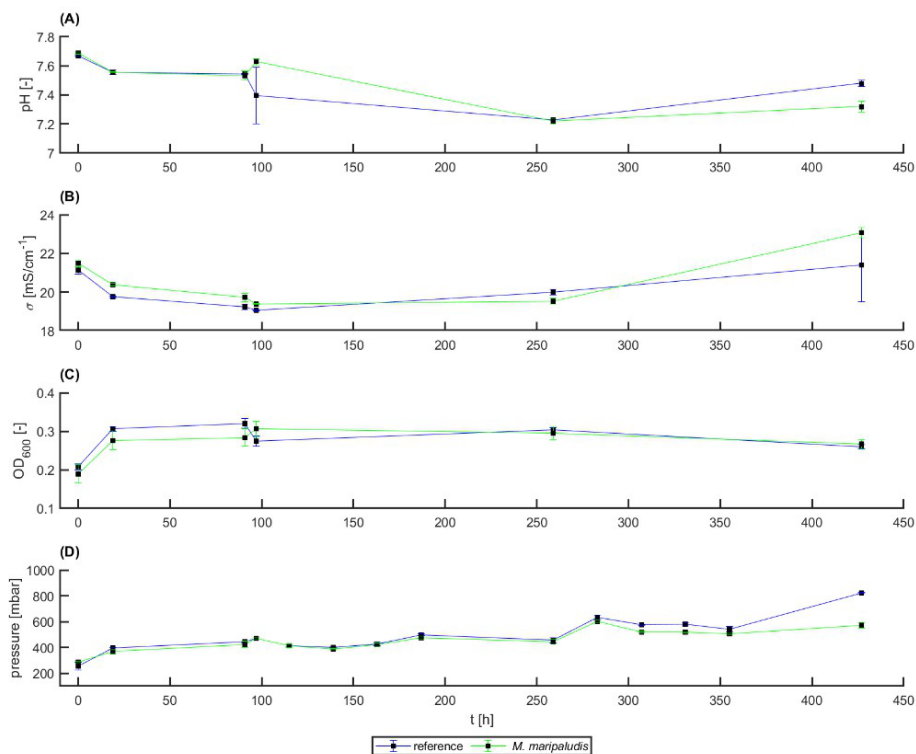


Abbildung 54 Physikochemische Daten von *Methanobacterium congolense* Kathode

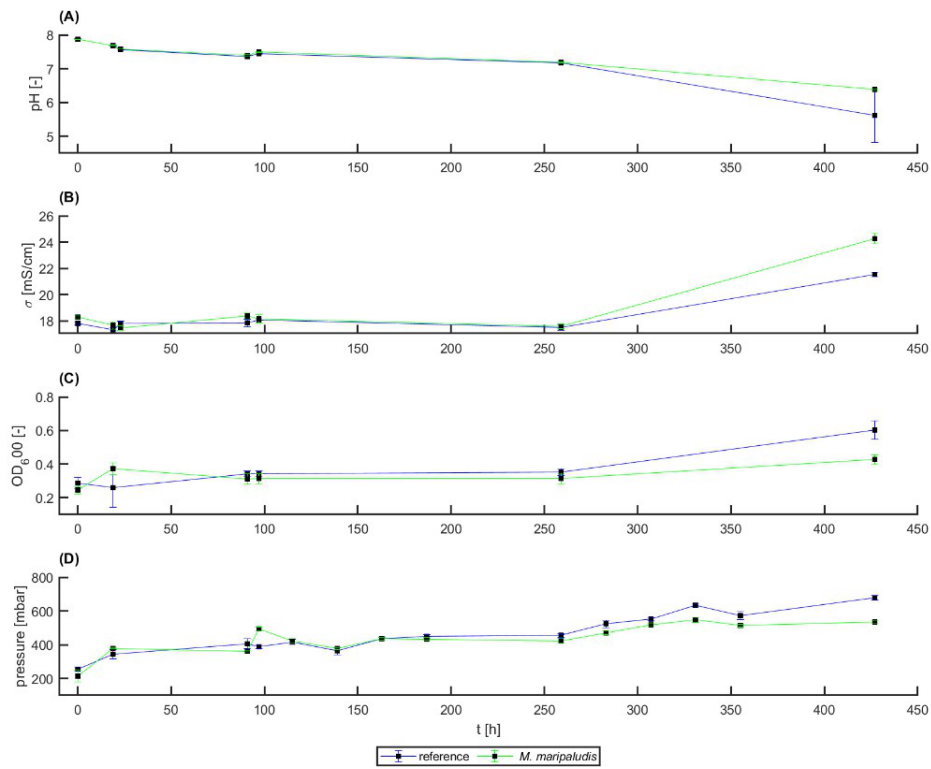


Abbildung 55 Physikochemische Daten von *Methanococcus maripaludis* Anode

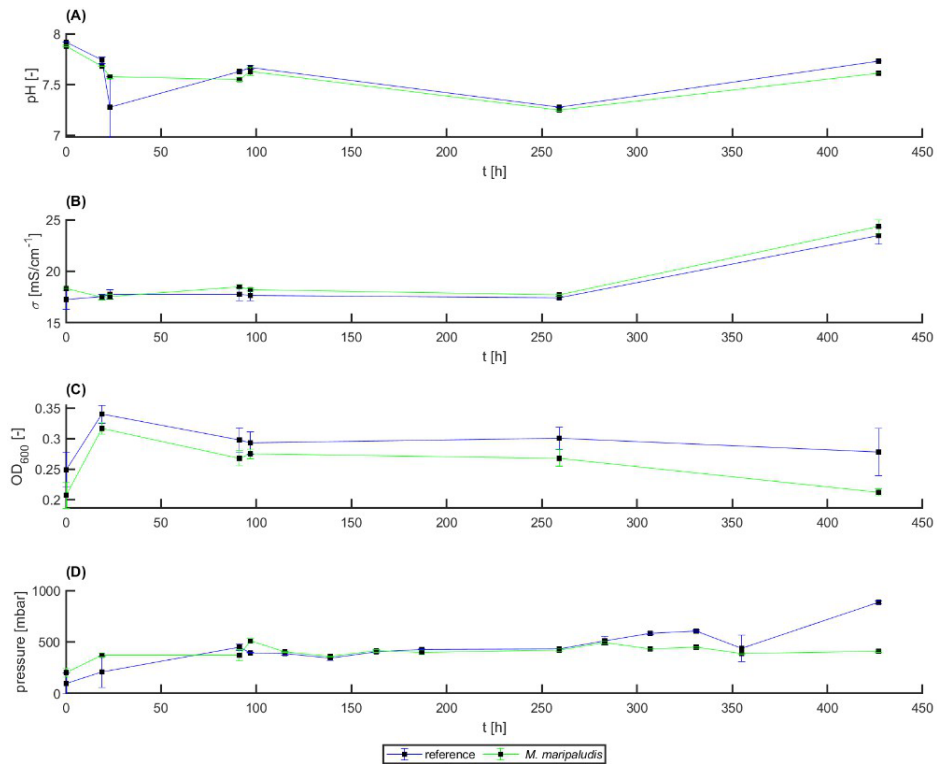


Abbildung 56 Physikochemische Daten von *Methanococcus maripaludis* Kathode

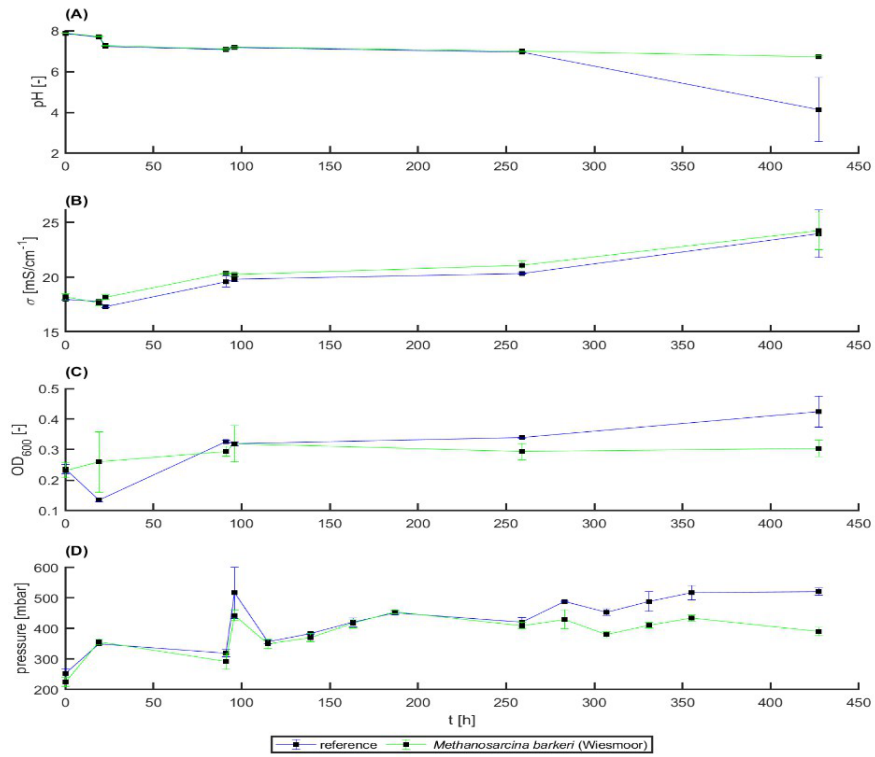


Abbildung 57 Physikochemische Daten von *Methanosarcina barkeri* Anode

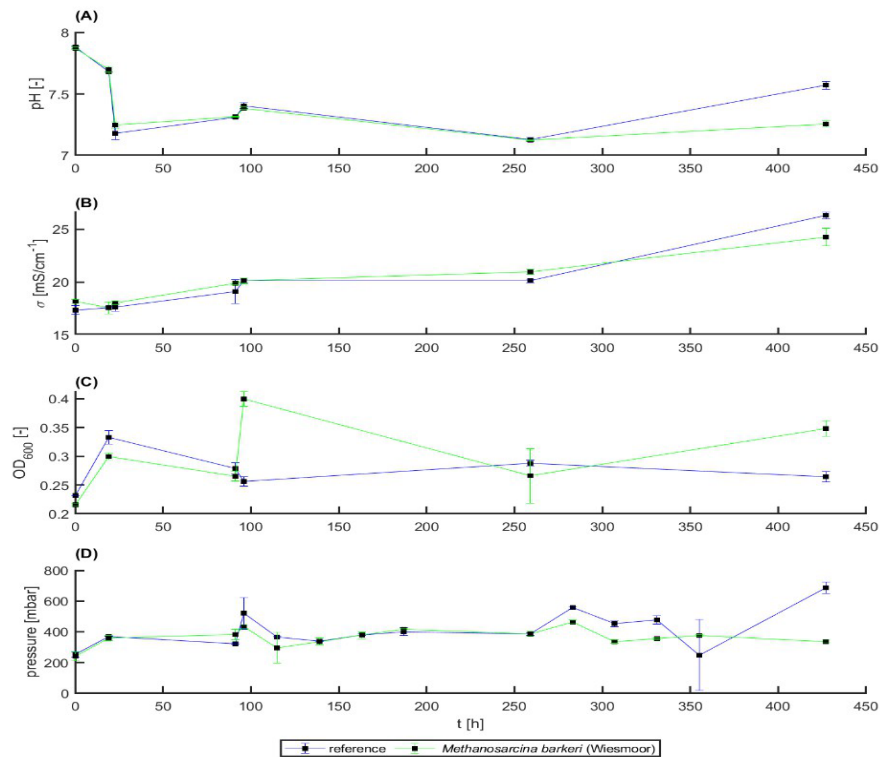


Abbildung 58 Physikochemische Daten von *Methanosarcina barkeri* Kathode

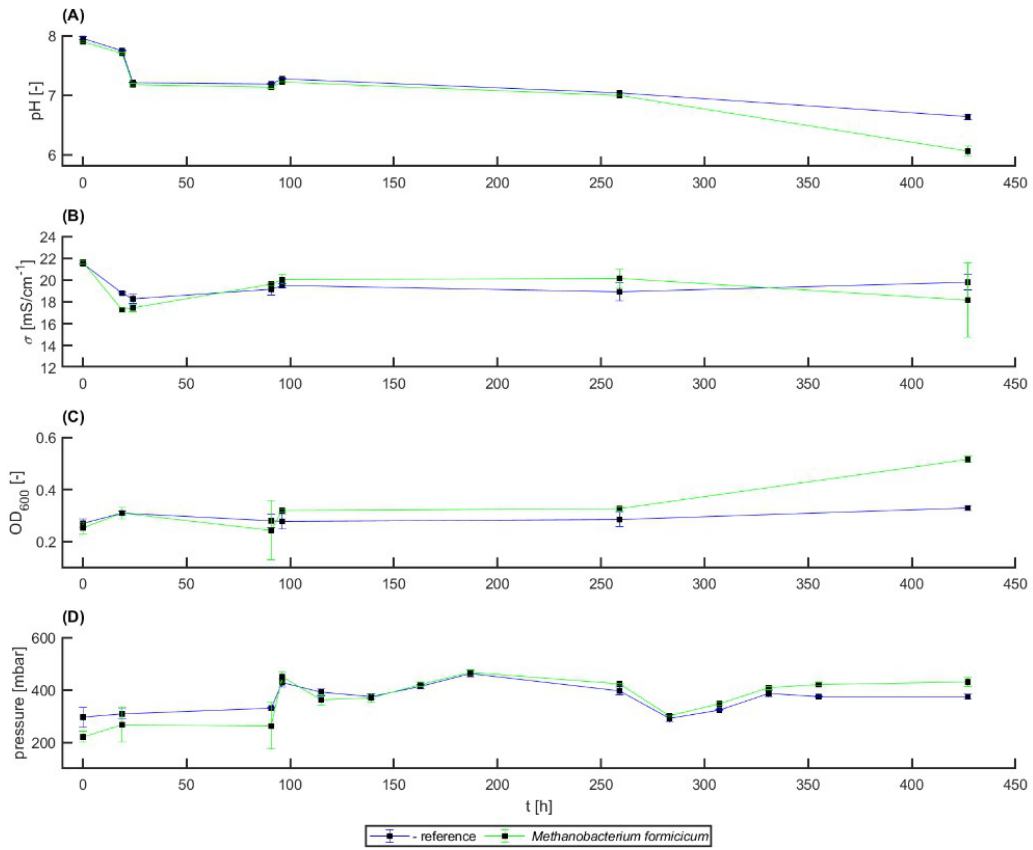


Abbildung 59 Physikochemische Daten von *Methanobacterium formicicum* Anode

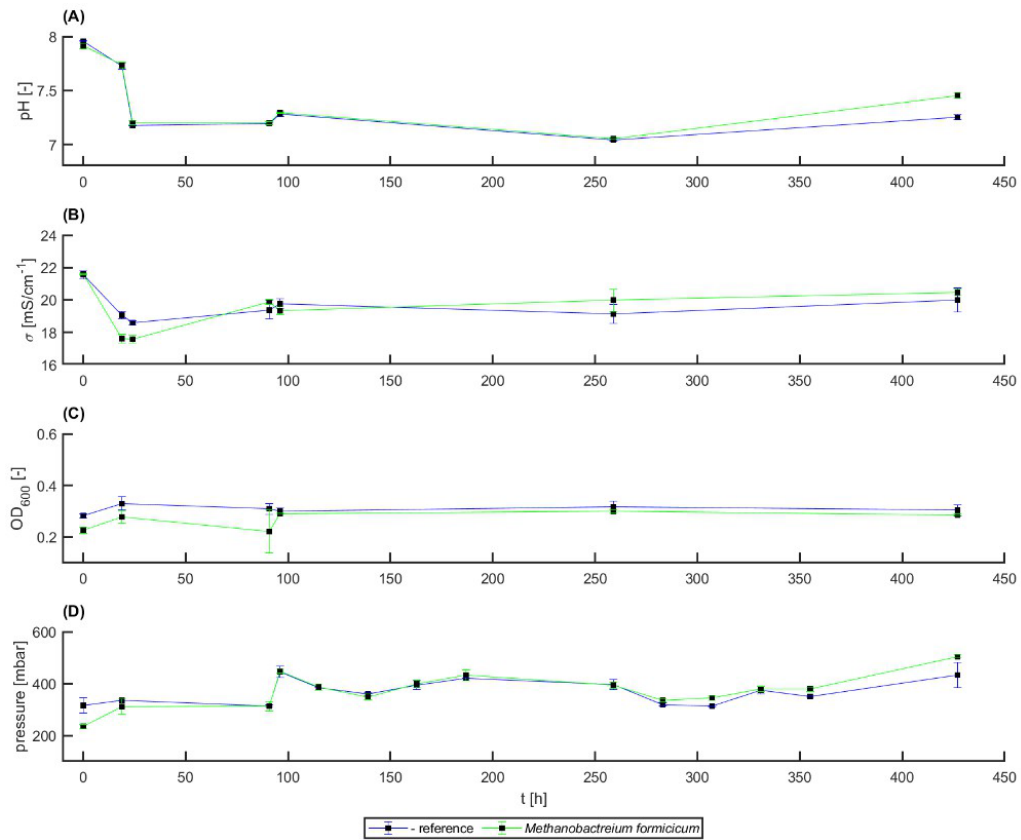


Abbildung 60 Physikochemische Daten von *Methanobacterium formicicum* Kathode

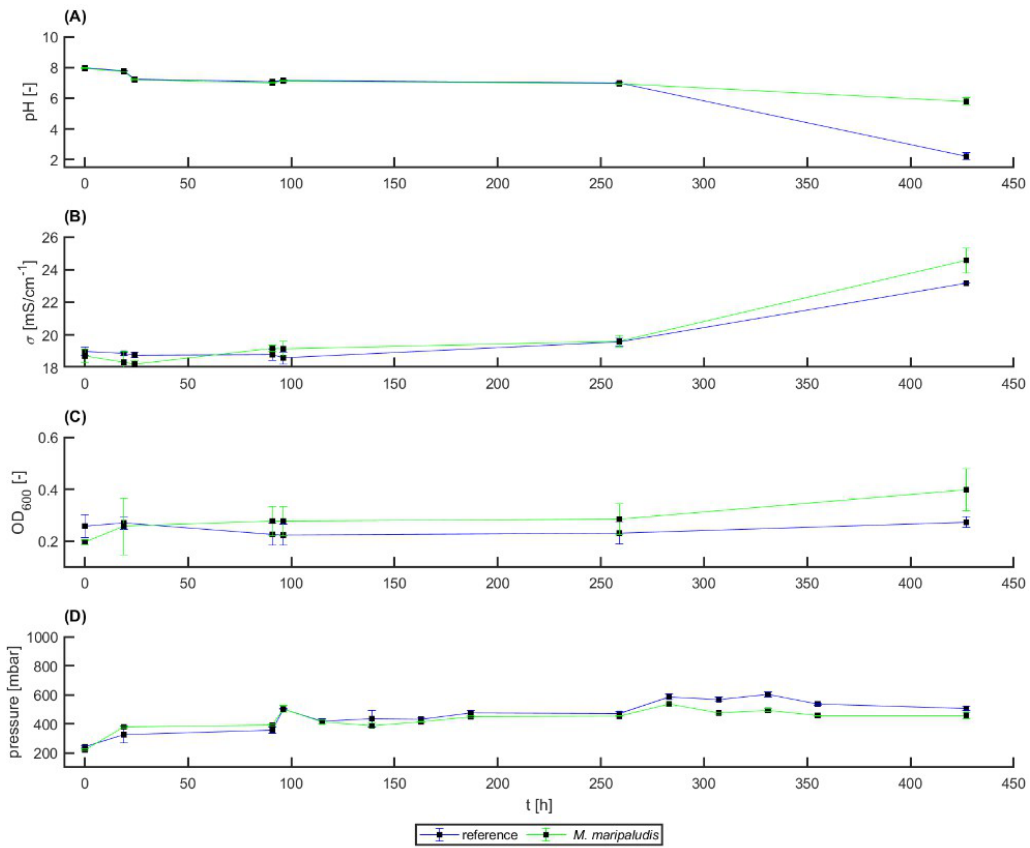


Abbildung 61 Physikochemische Daten von K11 Anode

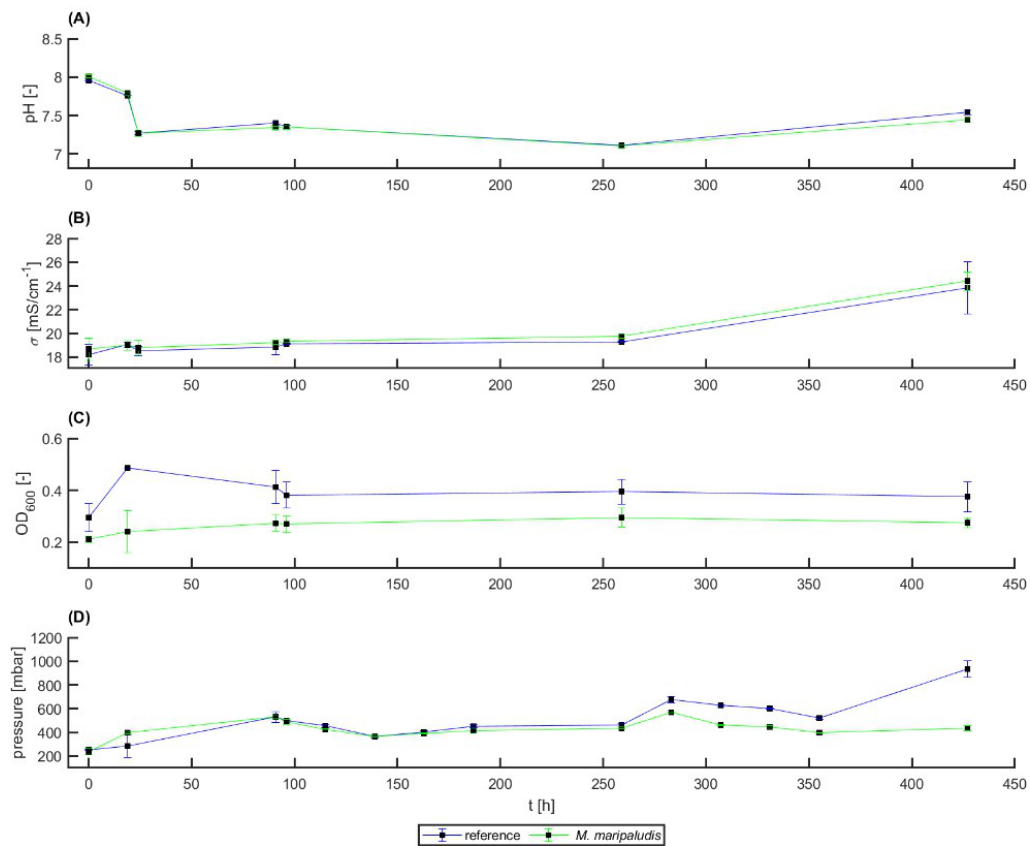


Abbildung 62 Physikochemische Daten von K11 Kathode

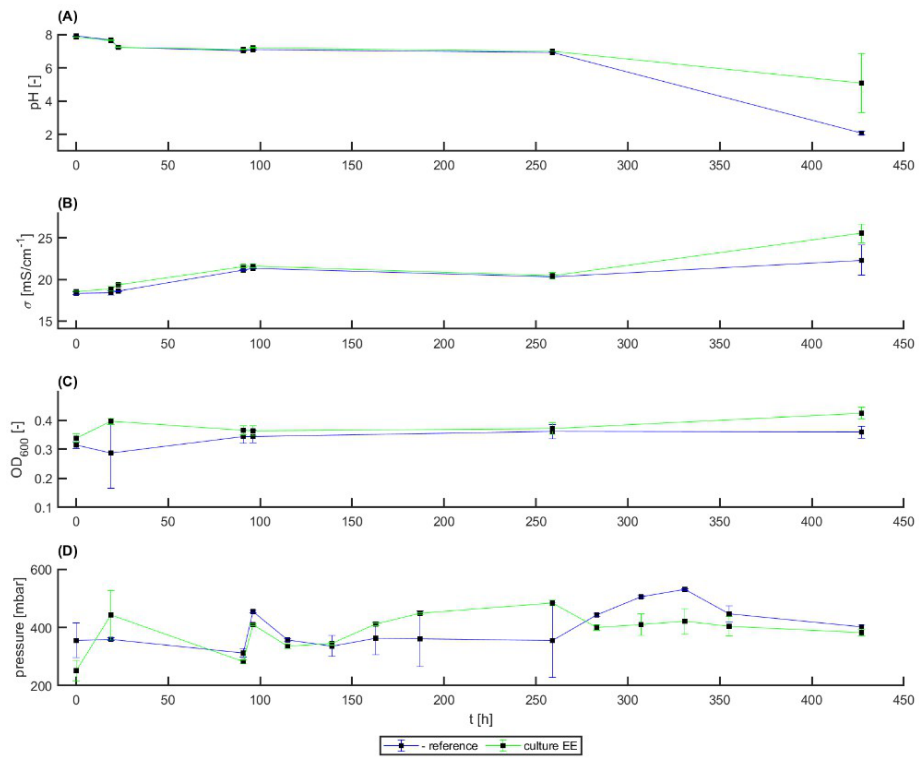


Abbildung 63 Physikochemische Daten von EE Anode

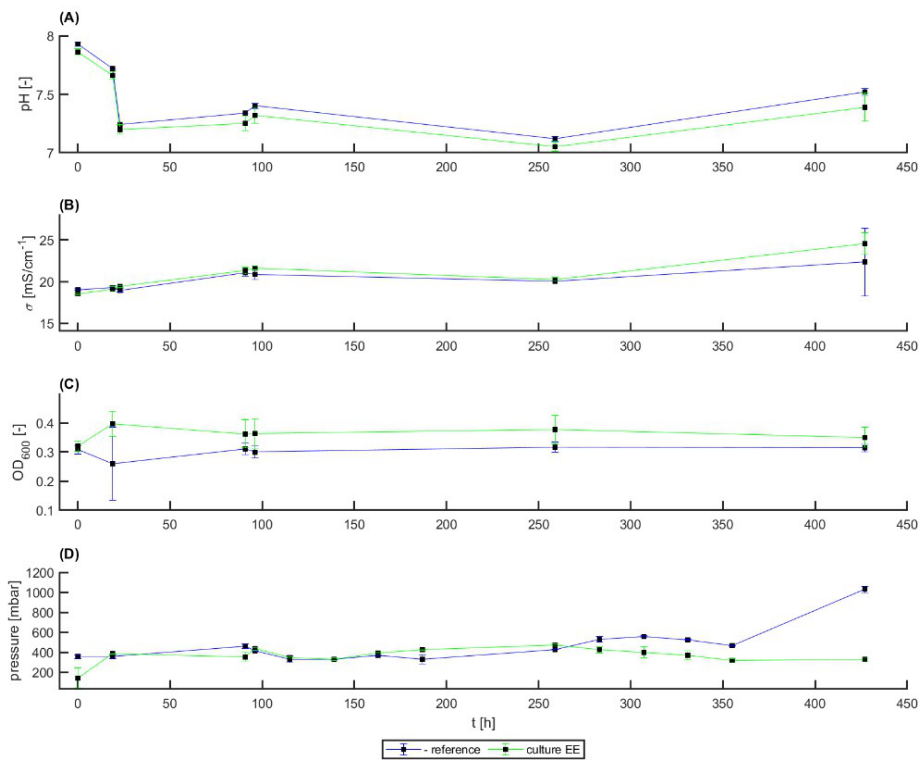


Abbildung 64 Physikochemische Daten von EE Kathode