

---

# Charakterisierung mikrobieller Elektrosynthesewege

---

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN  
(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften  
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

*genehmigte*

DISSERTATION

*von*

Christian Jonas LAPP

*KIT-Dekan:* Prof. Manfred WILHELM

*Referent:* Prof. Dr. Johannes GESCHER

*Korreferentin:* Prof. Anne-Kristin KASTER

Tag der mündlichen Prüfung: 13.04.2021

# Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die folgende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Alle wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Texten entnommenen Stellen sind von mir durch Angabe der Quelle gekennzeichnet. Diese Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Fassung noch nicht Bestandteil einer Prüfungsleistung. Weiterhin habe ich beim Anfertigen dieser Arbeit die Regeln zur Sicherung der guten wissenschaftlichen Praxis des KIT beachtet und alle Primärdaten gemäß Abs. A (6) am Institut für Angewandte Biowissenschaften archiviert. Des Weiteren versichere ich, dass die elektronische mit der schriftlichen Form dieser Arbeit übereinstimmt. Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von November 2017 bis März 2021 am Institut für Angewandte Biowissenschaften der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften des Karlsruher Instituts für Technologie unter der Leitung von Professor Johannes Gescher durchgeführt.

gezeichnet:

---

Ort, Datum:

---

# Zusammenfassung

Als Alternative zur Photosynthese bietet die mikrobielle Elektrosynthese eine vielversprechende Technologie, welche eine direkte Konversion von CO<sub>2</sub> durch den Eintrag elektrischer Energie ermöglicht. Kathodische Elektronen dienen dabei elektroautotrophen Mikroorganismen als alleinige Energie- und Elektronenquelle. In der Literatur beschriebene Organismen sind jedoch fast ausschließlich von einem wasserstoffvermittelten Elektronentransport abhängig. Da sich bei der kathodischen Wasserstoffentstehung abiotische mit biotischen Effekten überlagern, ist eine Charakterisierung der mikroben-Elektroden-Interaktion in diesem Fall jedoch kaum möglich. In dieser Arbeit wurde daher gezielt nach elektroautotrophen Organismen gesucht, welche nicht in der Lage sind Wasserstoff zu verwerten. Durch die Charakterisierung von *Sulfolobus acidocaldarius* auf einer Kathode gelang erstmals der Nachweis eines elektroautotrophen Wachstums mit einem alternativen extrazellulären Elektronenaufnahme (EEA)-Mechanismus. Entscheidende Elemente darin scheinen Schwefeltransferasen einzunehmen.

In einem zweiten Ansatz wurde für die Identifikation natürlicher EEAs eine kathodische Umweltschichtkultur charakterisiert. Ein vergleichbarer Mechanismus auf Basis von Schwefeltransferasen konnte ebenfalls im Hauptakteur der Kultur identifiziert werden. Dieser Stamm, welcher einen bisher unbekanntem Vertreter der Chromatiaceae darstellt, besitzt eine Verwandtschaft zu „*Ca. Tenderia electrophaga*“, einem elektrotrophen Bakterium aus einer marinen, kathodischen Anreicherung. Der Elektronentransport in diesem neuen Organismus scheint dabei neben Schwefeltransferasen auch über *c*-Typ Cytochrome vermittelt zu werden. *C*-Typ Cytochrome spielen in bioelektrochemischen Systemen eine entscheidende Rolle und wurden insbesondere in exoelektrogenen Stämmen an Anoden intensiv erforscht.

Als zweites Ziel dieser Arbeit wurde daher eine Methode entwickelt um verbesserte, synthetische Elektronentransportketten zu identifizieren. Basierend auf der heterologen Expression von verschiedenen, homologen Genen für *c*-Typ Cytochrome, konnte eine verbesserte Elektronentransferrate in *E. coli* erreicht werden. Diese setzt sich durch Gene aus den Modellorganismen *Shewanella oneidensis* und *Rhodospseudomonas palustris* zusammen.

Insgesamt konnten in dieser Arbeit grundlegende Erkenntnisse zur Identifikation und Entwicklung neuer elektroautotropher Organismen gewonnen werden.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>ii</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>v</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>vii</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>viii</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Stoffliche Nutzung von CO <sub>2</sub> . . . . .	1
1.1.1 Petrochemische Industrie . . . . .	4
1.1.2 Bioökonomie & Plattformchemikalien . . . . .	4
1.1.3 Mikrobielle Elektrosynthese . . . . .	5
1.2 Biologische CO <sub>2</sub> -Fixierung - Autotrophie . . . . .	7
1.3 Mikrobielle Elektronentransportketten . . . . .	10
1.3.1 Mikrobielle Energiekonservierung . . . . .	10
1.3.2 Extrazellulärer Elektronentransport (EET) . . . . .	10
1.3.3 Extrazelluläre Elektronenaufnahme - EEA . . . . .	15
1.4 Stand der Forschung - elektrotrophe Organismen . . . . .	19
1.4.1 Hydrogenotrophe . . . . .	19
1.4.2 Eisen- und Schwefeloxidierer . . . . .	22
1.4.3 Anreicherungskulturen . . . . .	23
1.5 Zielsetzung dieser Arbeit . . . . .	24
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>25</b>
2.1 Verwendete Mikroorganismen und Chemikalien . . . . .	25
2.1.1 Stammkultivierung und -erhaltung . . . . .	26
2.1.2 Anoxische Kultivierung von <i>S. oneidensis</i> und <i>E. coli</i> . . . . .	26
2.1.3 Kultivierung in bioelektrochemischen Systemen . . . . .	29
2.2 Bildgebende Methoden . . . . .	31
2.2.1 Fluoreszenzmikroskopie . . . . .	31
2.2.2 Optische Kohärenztomographie . . . . .	33



2.3	Molekularbiologische Methoden . . . . .	34
2.3.1	Klonierungsarbeiten . . . . .	34
2.3.2	Markerlose Ligation in <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	37
2.3.3	Stamm-Transformation . . . . .	38
2.4	Nukleinsäure-Aufreinigung und Analyse . . . . .	39
2.4.1	Isolierung von Plasmiden . . . . .	39
2.4.2	Isolierung genomischer DNA . . . . .	40
2.4.3	RNA-Isolierung . . . . .	40
2.4.4	Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration und -Reinheit . . . . .	41
2.5	Sequenzierungen . . . . .	41
2.5.1	Sanger-Sequenzierung . . . . .	41
2.5.2	Brückensynthese-Sequenzierung (Illumina) . . . . .	41
2.5.3	Nanopore-Sequenzierung . . . . .	42
2.6	Bioinformatische Methoden . . . . .	43
2.6.1	Generelle Sequenzanalysen und allgemeine <i>in silico</i> -Arbeiten . . . . .	43
2.6.2	Metagenom- und Metatranskriptomanalysen . . . . .	43
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>46</b>
3.1	Entwicklung synthetischer EET-Ketten . . . . .	47
3.1.1	Erstellung eines Zielvektors . . . . .	47
3.1.2	Simultane Klonierung synthetischer EET-Ketten . . . . .	50
3.1.3	Test auf Funktionalität in <i>S. oneidensis</i> . . . . .	53
3.1.4	Heterologe Expression in <i>E. coli</i> . . . . .	54
3.2	Identifikation natürlicher EEA-Mechanismen . . . . .	55
3.2.1	Sequenziererergebnisse . . . . .	55
3.2.2	Phylogenetische Analyse . . . . .	56
3.2.3	Metatranskriptom-Analysen . . . . .	60
3.3	Elektroautotrophie in <i>S. acidocaldarius</i> . . . . .	66
3.3.1	Kathodisches Wachstum von <i>S. acidocaldarius</i> . . . . .	66
3.3.2	Vergleichende Transkriptomanalyse in <i>S. acidocaldarius</i> . . . . .	70
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>77</b>
4.1	Entwicklung synthetischer EET-Ketten . . . . .	77
4.2	Identifikation natürlicher EEA-Mechanismen . . . . .	84
4.3	Elektroautotrophie in <i>S. acidocaldarius</i> . . . . .	90
4.4	Zusammenfassung und Ausblick . . . . .	97
	<b>Literatur</b>	<b>98</b>
<b>A</b>	<b>Anhang</b>	<b>110</b>

# Abbildungsverzeichnis

1.1	CO <sub>2</sub> -Emissionen . . . . .	2
1.2	Schema mikrobielle Elektrosynthese . . . . .	6
1.3	CO <sub>2</sub> -Fixierungswege-Wege . . . . .	8
1.4	Extrazellulärer Elektronentransport in <i>S. oneidensis</i> . . . . .	12
1.5	Elektronentransport in der Eisenoxidation . . . . .	17
1.6	Extrazelluläre Elektronenaufnahme-Mechanismen von einer Kathode . . . . .	18
1.7	Übersicht kathodischer Mikroorganismen . . . . .	20
2.1	Aufbau eines Elektrosynthesereaktors . . . . .	31
2.2	Aufbau einer Fließzellenperipherie . . . . .	32
3.1	Klonierungsstrategie des Plasmids pHCA . . . . .	49
3.2	pHCA-Induktionsstudie mit <i>yfp</i> . . . . .	49
3.3	Überlappspezifische Zufallsklonierung verschiedener EET-Module in pHCA . . . . .	51
3.4	Sequenzierergebnis des initialen Plasmidsets für synthetische EET . . . . .	52
3.5	Synthetischen EET-Plasmidsets in <i>E. coli</i> , <i>S. oneidensis</i> und <i>C. necator</i> . . . . .	52
3.6	Eisenreduktion durch Selektion eines EET-Plasmidsets auf Fe(III)-Citrat . . . . .	53
3.7	Eisenreduktion einer selektierten <i>E. coli</i> Kultur auf Fe(III) NTA . . . . .	54
3.8	Aufbau des Umwelthanreicherungsversuch . . . . .	55
3.9	Phylogenetische Analyse des kathodischen Metagenoms . . . . .	58
3.10	Phylogenetische Analyse kathodenspezifischer Taxa . . . . .	59
3.11	Genom- <i>alignment</i> mit „ <i>Candidatus. Tenderia electrophaga</i> “ . . . . .	59
3.12	Phylogenetische Analyse des Metatranskriptoms . . . . .	61
3.13	Zentraler Kohlenstoffmetabolismus von <i>Cd. Tenderia</i> . . . . .	64
3.14	Schwefelmetabolismus von <i>Cd. Tenderia</i> . . . . .	65
3.15	Höhenprofil des kathodischen <i>S. acidocaldarius</i> Biofilms. . . . .	68
3.16	<i>S. acidocaldarius</i> Biofilmvolumenentwicklung bei unterschiedlichen Potenzialen . . . . .	69
3.17	Oberflächen-Rauheit des kathodischen <i>S. acidocaldarius</i> Biofilms . . . . .	69
3.18	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von <i>S. acidocaldarius</i> auf der Kathode . . . . .	71
3.19	Hauptkomponentenanalyse der Transkriptomdaten . . . . .	71
3.20	CO <sub>2</sub> -Fixierungsgene in <i>S. acidocaldarius</i> . . . . .	73
3.21	Zentraler Kohlenstoffmetabolismusgene in <i>S. acidocaldarius</i> . . . . .	74

3.22	Energiekonservierung in <i>S. acidocaldarius</i> . . . . .	76
4.1	Hypothetisches EEA-Modell in „ <i>Ca. Tenderia</i> sp.” . . . . .	89
4.2	Hauptkomponentenanalyse zum Vergleich öffentlich zugänglicher Datensätze	92
4.3	Vergleich der katalysierten Reaktion zweier Carboxylasen in <i>S. acidocaldarius</i>	93
4.4	Hypothetisches EEA-Modell in <i>S. acidocaldarius</i> . . . . .	95
A.1	<i>E. coli</i> Proteinmenge im Fe(III)-NTA Reduktionsassay (Abb. 3.7 . . . . .	112
A.2	Phylogenetische Verteilung der Anreicherungskulturen . . . . .	112
A.3	<i>S. acidocaldarius</i> Biofilmvolumen während der Kultivierung bei unterschiedlichen Potenzialen . . . . .	113

# Tabellenverzeichnis

1.1	<i>Carbon capture &amp; utilization</i> (CCU) Technologien . . . . .	3
2.1	Verwendete Stämme . . . . .	25
2.2	Plasmidliste . . . . .	26
2.3	Zusammensetzung YPD-, LB-, SOB- und SOC-Medium . . . . .	27
2.4	Zusammensetzung des M4-Minimalmediums . . . . .	28
2.5	Zusammensetzung des M9-Minimalmediums . . . . .	28
2.6	Zusammensetzung 100x Spurenelemente für M4 und M9 . . . . .	28
2.7	Zusammensetzung des M88-Mediums . . . . .	29
2.8	Zusammensetzung Allen's Spurenelemente . . . . .	29
2.9	Zusammensetzung einer Mango-PCR . . . . .	34
2.10	Zusammensetzung einer PCR-BIO Hifi-PCR . . . . .	34
2.11	PCR-Programm . . . . .	35
2.12	Primerliste . . . . .	36
2.13	Zusammensetzung des TAE-Puffer . . . . .	37
2.14	Zusammensetzung des Transformationsmix . . . . .	38
2.15	Zusammensetzung SD-Medium . . . . .	38
2.16	Zusammensetzung des Zellyse Puffer . . . . .	40
2.17	Programme für die bioinformatische Auswertung . . . . .	44
3.1	Sequenzierungsergebnisse der Metagenome und -transkriptome . . . . .	56
3.2	Hochexprimierte Gene in „ <i>Cd. Tenderia</i> sp.“ . . . . .	63
3.3	Sequenzierungsergebnisse der <i>Sulfolobus</i> Transkriptome . . . . .	70
3.4	Transkription eines Schwefel-Metabolismus-Clusters . . . . .	76
4.1	Modulverteilung in verschiedenen Organismen . . . . .	79
A.1	Modulverteilung in verschiedenen Spezies . . . . .	111

# Abkürzungsverzeichnis

<b>Amp</b>	<b>Ampicillin</b>
<b>ATP</b>	<b>A</b> denosin <b>t</b> riphosphat
<b>BLAST</b>	<i><b>B</b>asic <b>L</b>ocal <b>A</b>lignment <b>S</b>earch <b>T</b>ool</i>
<b>BES</b>	<b>B</b> ioelektrochemisches <b>S</b> ystem
<b>bp</b>	<b>B</b> asenpaare
<b>CCU</b>	<i><b>C</b>arbon <b>c</b>apture and <b>u</b>tiliation</i>
<b>Chl</b>	<b>C</b> hloramphenicol
<b>DMSO</b>	<b>D</b> imethylsulfoxid
<b>DNA</b>	<i><b>D</b>esoxyribonucleic <b>a</b>cid</i> - Desoxyribonukleinsäure
<b>e<sup>-</sup></b>	Elektron
<b>EDTA</b>	<b>E</b> thylendiamintetraacetat
<b>EET</b>	<b>E</b> xtrazellulärer <b>E</b> lektronentransport
<b>EEA</b>	<b>E</b> xtrazelluläre <b>E</b> lektronenaufnahme
<b>g</b>	Erdbeschleunigung
<b>Gen</b>	<b>G</b> entamycin
<b>H<sup>+</sup></b>	Proton
<b>IPCC</b>	<i><b>I</b>ntergovernmental <b>P</b>anel on <b>C</b>limate <b>C</b>hange</i>
<b>Kan</b>	<b>K</b> anamycin
<b>KEGG</b>	<i><b>K</b>yoto <b>E</b>ncyclopedia of <b>G</b>enes and <b>G</b>enomes</i>
<b>KIT</b>	<b>K</b> arlsruhe <b>I</b> nstitut für <b>T</b> echnologie
<b>LB</b>	<i><b>L</b>ysogeny <b>b</b>roth</i>
<b>MES</b>	<b>M</b> ikrobielle <b>E</b> lektrosynthese <b>Z</b> elle
<b>MET</b>	<b>M</b> ikrobielle <b>E</b> lektrochemische <b>T</b> echnologie
<b>MFC</b>	<i><b>M</b>icrobial <b>F</b>uel <b>C</b>ell</i> - Mikrobielle Brennstoffzelle
<b>NAD<sup>+</sup></b>	<b>N</b> icotinamidadenindinukleotid
<b>NTA</b>	<b>N</b> itrilotriacetat
<b>OCP</b>	<i><b>o</b>pen <b>c</b>ircuit <b>p</b>otential</i> - Leerlaufspannung
<b>OCT</b>	<i><b>o</b>ptical <b>c</b>oherence <b>t</b>omography</i> - optische Kohärenztomographie
<b>OD</b>	<b>O</b> ptische <b>D</b> ichte
<b>ORI</b>	<i><b>O</b>rigin of replication</i> - Replikationsursprung
<b>PCR</b>	<i><b>P</b>olymerase-chain-reaction</i> - Polymerasekettenreaktion
<b>RNA</b>	<i><b>R</b>ibonucleic <b>a</b>cid</i> - Ribonukleinsäure
<b>RuBisCO</b>	<b>R</b> ibulose-1,5- <b>b</b> isphosphat-carboxylase/- <b>o</b> xxygenase
<b>SHE</b>	<i><b>S</b>tandard <b>H</b>ydrogen <b>E</b>lectrode</i> - Standard Wasserstoff Elektrode
<b>TE</b>	<b>T</b> ris <b>E</b> DTA
<b>TPM</b>	<i><b>T</b>ranscripts <b>p</b>er <b>m</b>illion</i>
<b>v/v</b>	<i><b>v</b>olume <b>p</b>er <b>v</b>olume</i>
<b>w/v</b>	<i><b>w</b>eight <b>p</b>er <b>v</b>olume</i>

# Kapitel 1

## Einleitung

*Der Klimawandel ist die größte gemeinsame Herausforderung der Menschheit*

— (UN Generalsekretär Ban Ki-Moon, 2014)

Unter allen Faktoren die zum Klimawandel führen ist keiner so entscheidend, wie die anthropogenen Kohlenstoffdioxid-Emissionen. Diese verursachen mittlerweile über 65% des Treibhauseffekts (Butler *et al.*, 2016). Leider steigen diese Emissionen jährlich seit über 150 Jahren aufgrund der Verbrennung fossiler Rohstoffe (siehe Abb. 1.1). Eine wirtschaftlich limitierte Zugänglichkeit dieser Rohstoffe ist unumstritten und zugleich sind sie essenziell für eine petrochemische Industrie. Um die Verbrennung fossiler Rohstoffe zu vermeiden, wird eine Konversion der globalen Enegiwirtschaft hin zu regenerativen Energiequellen angestrebt. Diese Umstellung ist nach aktuellem Kenntnisstand jedoch zu kostenintensiv und wahrscheinlich unzureichend um die Ziele des Pariser Klimaabkommen zu erfüllen. Diese sehen bis zum Jahre 2050 eine Erderwärmung von maximal 1,5 °C vor (Paris-agreement, 2015). Für das Erreichen dieser Ziele sind daher sogenannte negative Emissionen erforderlich. Durch den Einsatz so genannter „*carbon capture and storage*“ (CCS) Technologien soll das produzierte CO<sub>2</sub> in Lagerstätten konzentriert gespeichert werden um eine Emission in die Atmosphäre zu vermeiden. Dies liefert aber nur einen Aufschub des Problems, da eine weitere Verwertung des CO<sub>2</sub> nicht Bestandteil dieser Technologien ist.

### 1.1 Stoffliche Nutzung von CO<sub>2</sub>

Die Konzentration des Treibhausgases durch lokale Emissionen und CCS-Technologien, bietet jedoch eine Chance für „*carbon capture and utilization*“ (CCU) Technologien. Dabei wird eine Konversion des CO<sub>2</sub> in ein leicht lagerbares Produkt angestrebt, welches zugleich wirtschaftlich nutzbar ist. Ein Beispiel wäre die Konversion in ein Polymer, welches als Baustoff verwendet werden kann (Al-Mamoori *et al.*, 2017). Für eine zirkuläre Wirtschaft repräsentiert CO<sub>2</sub> ein ubiquitär vorkommendes, billiges Substrat.

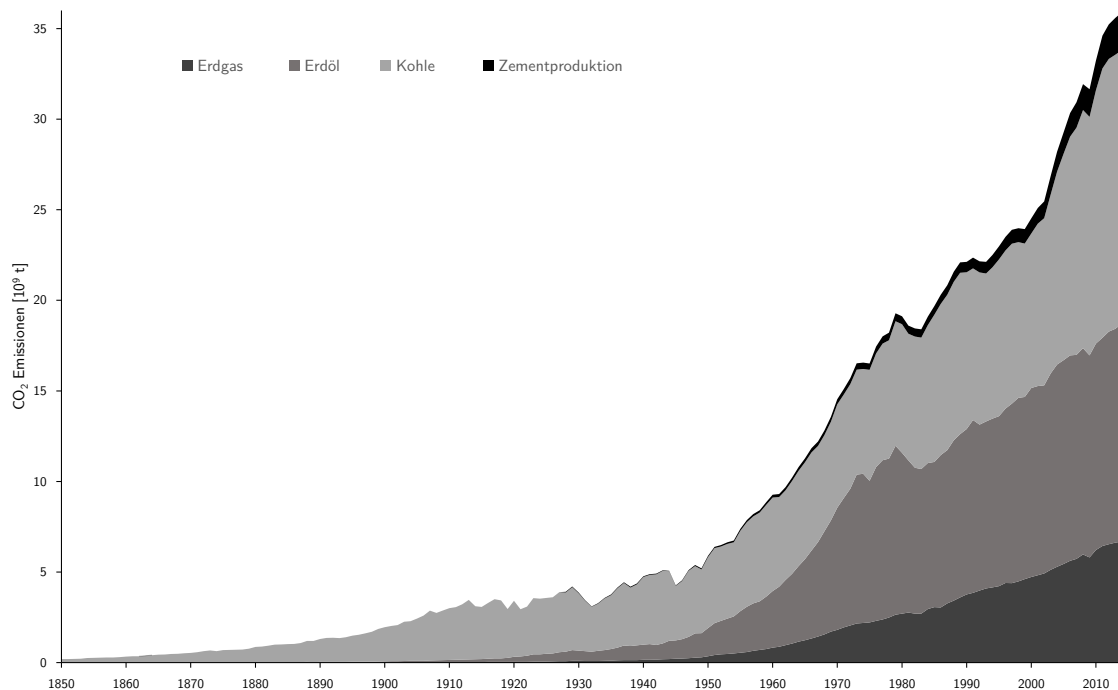


ABBILDUNG 1.1: Weltweite CO<sub>2</sub>-Emissionen aus der Verbrennung fossiler Brennstoffe und der Zementproduktion (verändert von Boden *et al.*, 2017).

Industriell lassen sich CO<sub>2</sub>-Emissionen kaum vermeiden. Selbst wenn sich die Emissionen aus den Sektoren Energie und Transport reduzieren lassen, so entstehen allein je etwa 6% aller Emissionen in den wachsenden Sektoren der Metall- und Zementindustrie (s. Abb. 1.1). In diesen Industriezweigen lassen sich prozessbedingt kaum CO<sub>2</sub> Emissionen einsparen (Raabe *et al.*, 2019; Boden *et al.*, 2017).

Die große Herausforderung an der stofflichen Nutzung von CO<sub>2</sub> ist die sehr niedrige Standardenthalpie des Moleküls ( $\Delta H_{f0}$  -396 kJ mol<sup>-1</sup>, Aresta *et al.*, 2014) und die damit einhergehenden Reaktionsträgheit. Die wenigen bekannten Prozesse, welche eine Reaktion mit CO<sub>2</sub> ermöglichen, beruhen daher auf entsprechend energiereichen Cosubstraten, wie z.B. Wasserstoff. Bereits etablierte CCU Ansätze nutzen meist elektrische Energie zur Produktion von Wasserstoff als intermediären Energieträger. Der Nachteil dieser Technologien liegt im geringen Wirkungsgrad der Elektrolyse, welcher in der Regel bei ca. 60-70% liegt (Buttler *et al.*, 2018).

Zusätzlich zum Energieträger ist für diese Prozesse eine CO<sub>2</sub>-Anreicherung notwendig, da das CO<sub>2</sub> zumeist nur anteilig in Abgasströmen vorhanden ist oder gar der Atmosphäre entzogen werden soll. Für bekannte CCU Technologien sind jedoch CO<sub>2</sub> Ströme mit hoher Reinheit und Konzentration von Nöten. Einige ausgewählte Prozesse welche potenziell eine wirtschaftliche CCU ermöglichen sind in Tabelle 1.1 aufgelistet.

TABELLE 1.1: Auflistung einiger Prozesse für *Carbon capture & utilization* (CCU) Technologien, mit zugrundeliegenden Reaktionsgleichungen und dem Gesamtwirkungsgrad der einzelnen Prozesse. Da für die chemische CO<sub>2</sub>-Verwertung zunächst eine Aufreinigung des Produkts und eine Wasserstoffproduktion nötig ist, werden zusätzlich die entsprechenden Prozesse mit dargestellt.

Prozess	Wirkungsgrad	Referenz
Wasserelektrolyse $2 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{ H}_2 + \text{O}_2$	70%	Buttler <i>et al.</i> , 2018
Methanisierung $4 \text{ H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{ H}_2\text{O}$	50-55%	Milanzi <i>et al.</i> , 2018
Direkte Methanolsynthese $3 \text{ H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$	<60%	Schemme, 2020
Co-Elektrolyse $2 \text{ H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CO} + 5 \text{ H}_2 + \text{O}_2$	<70%	König <i>et al.</i> , 2016
Fischer-Tropsch-Synthese $n \text{ CO} + 2n \text{ H}_2 \rightarrow \text{C}_n\text{H}_{2n+2} + n \text{ H}_2\text{O}$	50%	Schemme, 2020
CO <sub>2</sub> -Abscheidung	2 MWh / t CO <sub>2</sub>	Ishimoto <i>et al.</i> , 2017

Obwohl einige dieser Prozesse bereits lange etabliert sind, sind sie nun wieder Gegenstand aktueller und intensiver Forschung. Dabei wird eine Optimierung dieser Prozesse angestrebt um das Potenzial dieser CCU Technologien besser nutzen zu können. Neben dem geringen Wirkungsgrad sind die Prozesse von präzisen Parametern abhängig. Zudem liefern sie meist wirtschaftlich nicht konkurrenzfähige Produkte. Als eines der bekanntesten CCU-Projekte, gilt die George Olah Anlage auf Island. Dem geringen Wirkungsgrad steht bei dieser Anlage der Standortvorteil gegenüber. Durch die besonderen geologischen Bedingungen auf Island liegen kostengünstige, regenerative Energiequellen, sowie hohe CO<sub>2</sub>-Konzentrationen als Substrat vor. Das Produkt dieser Anlage – Methanol – wird primär als Kraftstoff genutzt (Richter, 2019).

Für die industriell relevantere Synthese langkettiger Kohlenwasserstoffe dient die Fischer-Tropsch-Synthese. Durch Variationen in den Prozessparametern lassen sich sowohl Alkane, Alkene und Alkohole in nahezu beliebigen Kettenlängen produzieren. Jedoch sind ebendiese Parameter im Prozess auch entsprechend störanfällig. Als Produkt entsteht stets ein Gemisch mit einer hohen Kettenlängenverteilung. Zusammenfassend sind die wichtigsten Nachteile der chemischen CCU Verfahren für die Fischer-Tropsch-Synthese besonders deutlich. Ein hoher Energieeintrag, hohe Anforderungen an die Edukte und Produkte, welche bisweilen nur als intermediäre Energieträger eingesetzt werden, sowie die sequenzielle Anordnung komplexer Prozessanlagen führen zu sehr hohen Investitions- und effizienzbedingten Betriebskosten.



Der Fischer-Tropsch-Synthese wird unter den CCU Technologien jedoch eine besondere Bedeutung beigemessen, da es als einzige Technologie ein Produkt liefert, welches Erdöl als Edukt in der petrochemischen Industrie ersetzen kann (Maitlis *et al.*, 2013).

### 1.1.1 Petrochemische Industrie

Die Substitution fossiler Rohstoffe wird aufgrund der begrenzten Vorkommen eine immer größere Rolle für petrochemische Prozesse einnehmen. Etwa 6-7% der Erdölfördermenge fließt in die Produktion verschiedener Polymere, Farben, Reinigungs- und Arzneimittel. Für viele dieser Produkte existieren keine oder nur sehr aufwendige Alternativen auf Basis nachwachsender Rohstoffe. Aktuelle Berechnungen gehen von Erdölreserven für die nächsten 50 Jahre aus. Diese Zahl basiert auf den aktuell bekannten Mengen förderbarer Ölvorkommen und politischen Rahmenbedingungen. Diese Faktoren ändern sich jedoch beständig, wodurch diese statistische Kennziffer zuletzt starken Schwankungen unterworfen war. Sie spiegelt daher nicht unbedingt die tatsächliche Verfügbarkeit des Rohstoffs wieder. Eine langfristige Betrachtung des Ölpreises gibt hingegen ein deutlicheres Bild von den wirtschaftlich nutzbaren Erdölreserven, welche deutlich geringer ausfallen können (Holland, 2008). Langfristig muss daher nach Alternativen zu petrochemischen Prozessen gesucht werden.

### 1.1.2 Bioökonomie & Plattformchemikalien

Das Stichwort Bioökonomie steht für ein Konzept einer postfossilen Wirtschaft. Unter diesem Begriff werden mehrere Strategien zusammengefasst mithilfe derer erdölbasierte Prozesse ersetzt werden können. Im Fokus stehen dabei unter anderem der Erhalt der Biodiversität, Luft-, Wasser- und Bodenqualität, sowie das Erreichen der Klimaziele (Ubando *et al.*, 2020).

Eine Industrie, welche Biomasse zu wertgesteigerten Produkten veredelt ist dafür essenziell. Im Idealfall können diese Produkte nicht nur mit erdölbasierten Produkten konkurrieren, sondern weisen darüberhinaus für biobasierte Produkte typische Vorteile auf. Beispiele sind eine höhere Biokompatibilität, komplexere chemische Zusammensetzungen, neue (stereoselektive) chemische Modifikationen oder eine kosteneffizientere Produktion hochreiner Produkte (Vinod *et al.*, 2020).

Eine Einbettung biobasierter Rohstoffe in die chemische Industrie wird durch Plattformchemikalien realisiert. Dieser Begriff beschreibt Substanzen, welche als Zwischenprodukt aus einer Vielzahl von Substraten in großen Mengen effizient gewonnen, und in bereits existierende Prozesse integriert werden können (Bozell *et al.*, 2010).

### 1.1.3 Mikrobielle Elektrosynthese

Die Mikrobielle Elektrosynthese (MES) stellt eine noch recht junge Technologie dar, welche eine vielversprechende Alternative zu chemischen CCU-Technologien darstellt (Jourdin *et al.*, 2020). Schlüsselement dieser Technologie stellen Mikroorganismen dar, welche in der Lage sind elektrischen Strom von einer Kathode als einzige Energie- und Elektronenquelle zu nutzen. Analog zur Photosynthese können diese Organismen CO<sub>2</sub> als alleinige Kohlenstoffquelle nutzen um Biomasse aufzubauen. Der schematische Aufbau eines entsprechenden Bioelektrochemischen Systems ist in Abb. 1.2 gezeigt. Das Kultivierungsmedium dient zugleich als Elektrolyt zwischen zwei Elektroden, welche durch eine Protonenpermeable Barriere voneinander getrennt sind. Über einen Potentiostaten wird ein definiertes Potenzial an der Arbeitselektrode angelegt, in diesem Fall der Kathode. Als Kohlenstoffquelle dient CO<sub>2</sub>, welches im Medium gelöst als Substrat vorliegt. In diesem System lässt sich ein gesamter CCU-Prozess zu wertgesteigerten Produkten biologisch katalysieren. Gegenüber klassischen Technologien verspricht die MES einige Vorteile zu haben.

Zunächst lässt sich eine kosteneffiziente Konversion des CO<sub>2</sub> durch eine Produktion entsprechend wirtschaftlich gefragter Materialien ,wie Plattformchemikalien, und anderen wertgesteigerten Substanzen realisieren.

Da neben Sonnenlicht eine Vielzahl anderer regenerativer Stromquellen genutzt werden können, entsteht keine Flächenkonkurrenz zu pflanzenbasierten Technologien. Mikrobielle Elektrosynthesysteme zeigen dabei im Vergleich eine sehr viel effizientere Verwertung der elektrischen Energie, da die energieaufwendige Elektrolyse sowie die sequenzielle Anordnung von Prozessen vermieden werden können. (Deutzmann *et al.*, 2017).

Durch die Nutzung elektrischer Energie kann das CO<sub>2</sub> auch an Orten mit entsprechendem Standortvorteil reduziert werden. Auch sind die Ansprüche von Mikroben an die Substratreinheit meistens sehr viel geringer, wodurch auch CO<sub>2</sub>-Quellen genutzt werden können, welche bisher wirtschaftlich unrentabel sind. Verunreinigungen durch andere Gase können von vielen Mikroben sogar als Cosubstrat genutzt werden (Reiner *et al.*, 2020).

Bei der mikrobiellen Elektrosynthese handelt es sich jedoch um eine sehr junge Technologie, welche bisher kaum zur Anwendung kommt. Das mit Abstand häufigste Produkt der mikrobiellen Elektrosynthese ist bisher Acetat (Jourdin *et al.*, 2020). Dieses kann zwar sehr energieeffizient synthetisiert werden (Deutzmann *et al.*, 2017) besitzt jedoch keine große marktwirtschaftliche Relevanz. Die Aktivität acetogener Bakterien ermöglicht in diesen Systemen grundsätzlich auch die Produktion langkettiger Kohlenwasserstoffe wie Capronsäure und Caprylsäure, allerdings werden dabei bisher nur sehr geringe Ausbeuten erreicht (Van Eerten-Jansen *et al.*, 2013).

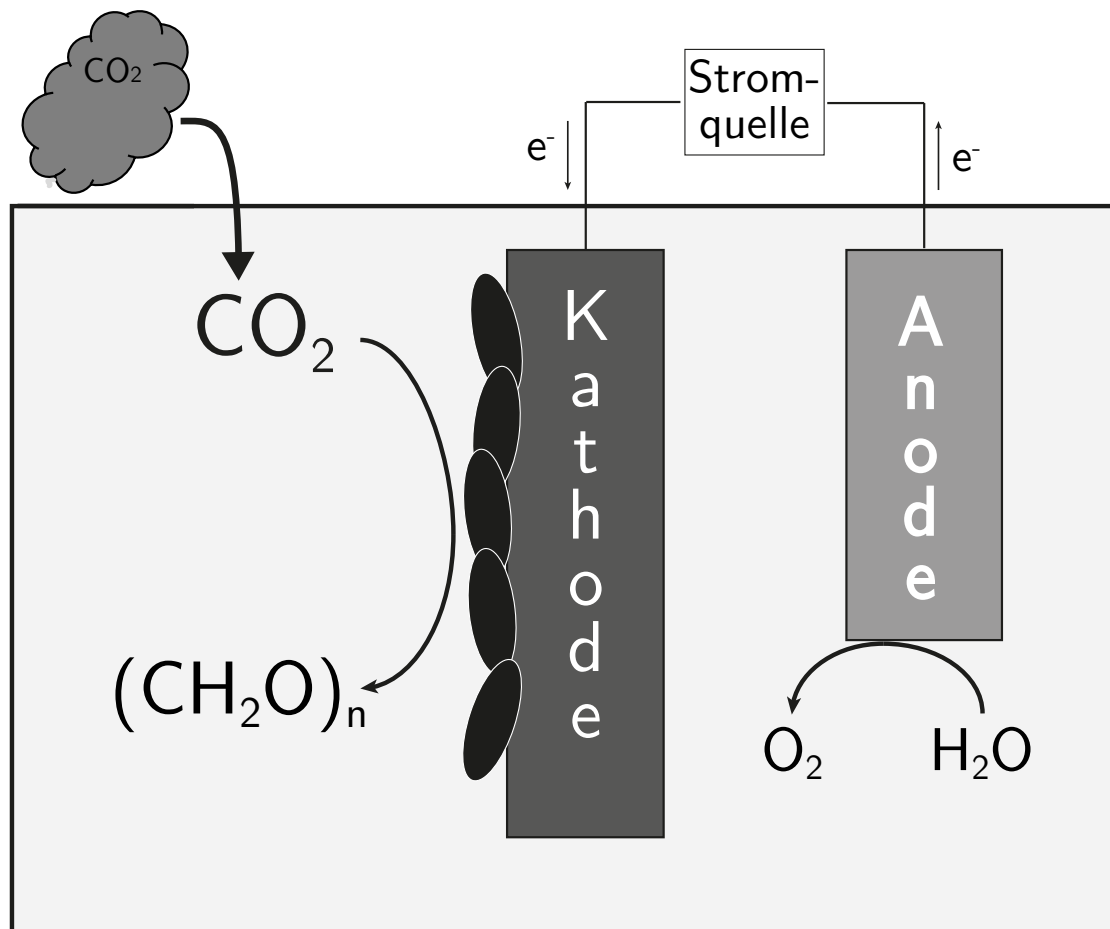


ABBILDUNG 1.2: Schematische Darstellung eines mikrobiellen Elektrosynthese-Setups. Mikroorganismen beziehen Elektronen von der Kathode für die Reduktion von  $\text{CO}_2$  und für die Energiekonservierung. An der Anode wird Wasser gespalten um Elektronen für die Kathode bereitzustellen.

Für eine Weiterentwicklung des Systems ist daher zunächst eine Ausweitung der Produktpalette notwendig. Durch die Nutzung alternativer Mikroorganismen als Biokatalysator ist die Produktion von Biopolymeren in mikrobiellen Elektrosynthesystemen gelungen (Reiner *et al.*, 2020; Rengasamy *et al.*, 2020). Über die Mechanismen der  $\text{CO}_2$ -Fixierung und die Produktion wertgesteigerter Produkte sind bereits weitreichende Kenntnisse erlangt worden. Über das Schlüsselement, um diese Technologie auf weitere Prozesse übertragen zu können - die Nutzung elektrischer Energie durch Mikroorganismen - ist jedoch kaum etwas bekannt.

## 1.2 Biologische CO<sub>2</sub>-Fixierung - Autotrophie

Da CO<sub>2</sub> für die Entstehung des Lebens vermutlich als erste Kohlenstoffquelle diente (Wächtershäuser, 2007; Martin *et al.*, 2003), handelt es sich bei der CO<sub>2</sub>-Fixierung wohl um einen der ältesten Mechanismen im biologischen Kohlenstoffkreislauf. Organismen, welche CO<sub>2</sub> als einzige Kohlenstoffquelle verwenden, werden als autotroph (alt Gr. *αυτος* *autos* „selbst“ und *τροφή* *trophe* „sich ernähren“) bezeichnet. Mittlerweile sind sechs verschiedene CO<sub>2</sub>-Fixierungswege bekannt, welche zur Autotrophie befähigen. Die Stoffwechselwege sind in Abbildung 1.3 dargestellt. Vermutlich existieren jedoch noch mehr CO<sub>2</sub>-Fixierungswege (Fuchs, 2011). So wurde erst vor zwei Jahren eine Variation des reversen TCA-Zyklus beschrieben - der roTCA (Mall *et al.*, 2018). Zusätzlich sind aktuell synthetische CO<sub>2</sub>-Fixierungswege in Entwicklung. Die Funktionalität eines solchen Synthesewegs wurde erstmals mit dem CETCH-Zyklus Schwander *et al.*, 2016 *in vitro* gezeigt.

### Calvin-Benson-Bassham-Zyklus

Der bekannteste und zugleich quantitativ bedeutendste CO<sub>2</sub>-Fixierungsweg ist der Calvin-Benson-Bassham-Zyklus (CBB). Mindestens 90% der globalen CO<sub>2</sub> Vorkommen werden durch diesen Weg in den natürlichen Kohlenstoffkreislauf zurückgeführt. Das Schlüsselenzym, die Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase (RuBisCO), gilt als das anteilig häufigste Protein der Erde. Alle Pflanzen, Grün- und Blaualgen, sowie die meisten Bakterien und einige Archaeen assimilieren Kohlenstoff durch diesen Zyklus. Der große evolutionäre Erfolg dieses Fixierungswegs kann auf die Entkopplung vom zentralen Kohlenstoffmetabolismus und die hohe Sauerstofftoleranz des Prozesses zurückgeführt werden (Bassham *et al.*, 1950).

### Wood-Ljungdahl-Weg

Der Wood-Ljungdahl-Weg oder reduktiver Acetyl-CoA-Weg ist der zweite CO<sub>2</sub>-Fixierungsweg, welcher weitgehend vom zentralen Kohlenstoffmetabolismus entkoppelt ist, da die Intermediate kaum in anderen Stoffwechselwegen involviert sind. Im Gegensatz zum CBB-Zyklus ist der Weg jedoch sauerstoffsensitiv. Als einziger energiekonservierender Mechanismus, der CO<sub>2</sub> als Elektronenakzeptor nutzt, kann dieser Weg auch für die Gewinnung von ATP genutzt werden. Damit stellt es auch den einzigen CO<sub>2</sub>-Fixierungsweg dar, welcher nicht zirkulär ist und nicht allein der Kohlenstoffassimilation dient. Energetisch betrachtet kann dieser daher auch als der effizienteste CO<sub>2</sub>-Fixierungsweg betrachtet werden. Diese Form der anaeroben Atmung wird aufgrund der geringen Energieausbeute auch als Lebensform am thermodynamischen Limit bezeichnet. Im Stoffumsatz wird deshalb nur ein geringer Anteil des Kohlenstoffs für zelluläre Synthesen genutzt. Als primäres Produkt entsteht entweder Methan oder Acetat. Der Wood-Ljungdahl-Weg stellt vermutlich den ältesten CO<sub>2</sub>-Fixierungsweg dar (Ljungdahl, 1986).

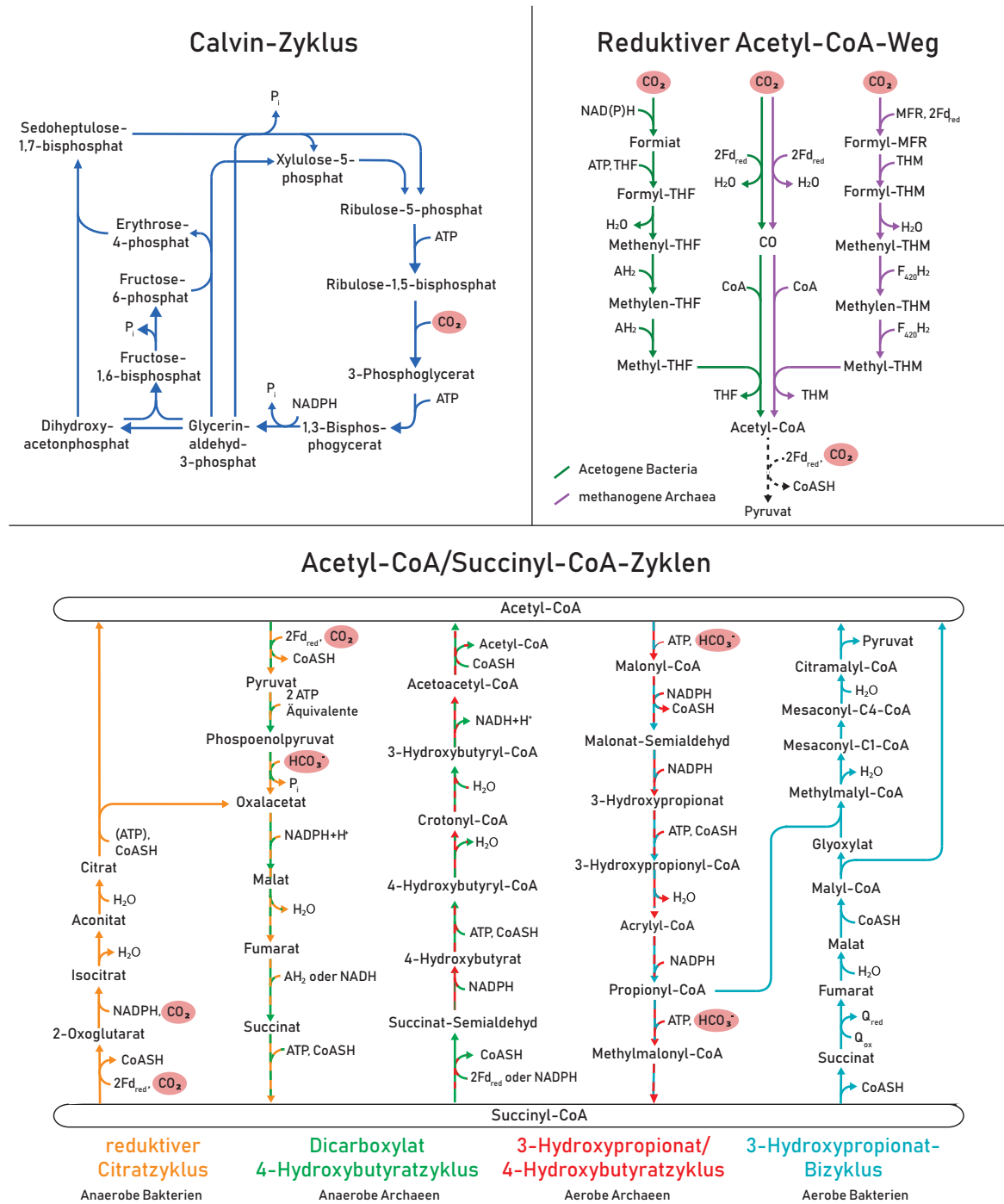


ABBILDUNG 1.3: Schematische Darstellung aller sechs bekannten CO<sub>2</sub>-Fixierungswege. Verändert nach Fuchs *et al.*, 2017 und Bar-Even *et al.*, 2012. Fd - Ferredoxin; red. - reduziert; ox. - oxidiert; Q - Quinon, AH - reduzierter Elektronendonator; THF - Tetrahydrofolsäure; MFR - Methanofuran; THM - Tetrahydromethanopterin.

### reverser TCA Zyklus

Die vier weiteren, bekannten CO<sub>2</sub>-Fixierungswege sind in verschiedener Form dem zentralen Kohlenstoffmetabolismus angegliedert und produzieren als Intermediate Acetyl-CoA und Succinyl-CoA. Allein auf Grund genetischer Analysen sind diese Wege daher zum Teil schwer zu identifizieren. Der reduktive Zitratzyklus (rTCA) unterscheidet sich nur in mindestens zwei enzymatischen Teilschritten vom oxidativen Zitratzyklus (oTCA). Die NAD-abhängige 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase wird durch eine Ferredoxin-abhängige 2-Oxoglutarat-Synthase ersetzt und die Succinat-Dehydrogenase durch eine Fumarat-Reduktase. In den meisten bekannten Organismen, die diesen Zyklus nutzen, wird zusätzlich die Zitratspaltung zu Acetyl-CoA und Oxalacetat durch ein zusätzliches Enzym katalysiert, der ATP-Zitrat-Lyase. Energetisch ist diese Umkehrung des oTCA vergleichbar mit der Effizienz des Wood-Ljungdahl-Weg. Mit einem Verbrauch von nur 1-3 ATP ist für die Fixierung eines CO<sub>2</sub>-Moleküls daher ein geringerer Energieeintrag als bei anderen rein assimilatorischen CO<sub>2</sub>-Fixierungswegen notwendig. Diese Art der CO<sub>2</sub>-Fixierung kommt auf Grund der Ferredoxin-abhängigen, sauerstoffsensitiven Carboxylasen vor allem in anaeroben Bakterien vor. Sie gehört evolutionär vermutlich mit dem WL-Weg zu den ältesten CO<sub>2</sub>-Fixierungswegen (Evans *et al.*, 1966).

### 4-Hydroxybutyrat Zyklen

Zwei CO<sub>2</sub>-Fixierungswege kommen ausschließlich in Archaeen vor und haben das namensgebende 4-Hydroxybutyrat (4-HB) als Intermediat. Durch eine sukzessive Reduktion des Succinyl-CoA über 4-Hydroxybutyryl-CoA können zwei Acetyl-CoA gewonnen werden, welche als Substrat für eine Assimilation von je 2 CO<sub>2</sub> dienen. Eine Assimilation über einen Teil des reduktiven Zitratzyklus findet im ebenfalls sauerstoffsensitiven Dicarboxylat/4-HB-zyklus statt und findet sich in einigen Thermoproteales sowie Desulfurococcales. Eine sauerstofftolerante Assimilation über 3-Hydroxypropionyl-CoA findet sich in hauptsächlich aeroben Vertretern der Sulfolobales und Thaumarchaeota (Berg *et al.*, 2010).

### 3-Hydroxypropionat Bizyklus

3-Hydroxypropionat (3-HP) ist in der Natur ein ungewöhnliches Intermediat und bisher nur für zwei CO<sub>2</sub>-Fixierungswege bekannt (s.o.). Dieser zweite Weg ist der 3-HP-Bizyklus, in welchem Acetyl-CoA statt über 4-HB, über einen namensgebenden Bizyklus regeneriert wird. Im ersten Zyklus wird über Succinyl-CoA ein Acetyl-CoA regeneriert und ein Glyoxylat produziert. Dieses ermöglicht im zweiten Zyklus zusammen mit Propionyl-CoA die Regeneration eines zweiten Acetyl-CoA. Als Endprodukt entsteht Pyruvat. Dieser sauerstofftolerante CO<sub>2</sub>-Fixierungsweg wurde bisher nur in einem Bakterium nachgewiesen (*Chloroflexus aurantiacus*) Jedoch wurden entsprechende Gene auch in nah verwandten Spezies entdeckt (Holo *et al.*, 1986).

## 1.3 Mikrobielle Elektronentransportketten

### 1.3.1 Mikrobielle Energiekonservierung

Der Transport von Elektronen ist die Grundlage von nahezu jedem biologischen Prozess. Bei den meisten Reaktionen des Metabolismus handelt es sich um Redox-Reaktionen. Doch um Leben zu ermöglichen sind allen voran Reaktionen der Energiekonservierung - des Katabolismus notwendig. In den meisten Organismen reagieren dabei lösliche Elektronenakzeptoren und -donoren über mehrere zwischengeschaltete Reaktionen, die eine schrittweise Konservierung der Energie in Form von ATP ermöglichen. Meist stellt die Ausbildung eines elektrochemischen Ionengradienten entlang einer Membran einen entscheidenden Zwischenschritt dar. Bei Standardbedingungen, bestimmt die Differenz im Redoxpotenzial zwischen Substraten und Produkten den Betrag der freiwerdenden Energie.

Dieser grundlegende Mechanismus findet in einigen Organismengruppen spezielle Sonderformen. In der Gärung dient ein Substrat zugleich als Elektronendonator und -akzeptor. Die ATP-Synthese erfolgt dabei durch eine Substratkettenphosphorylierung, wodurch eine Energiekonservierung unabhängig von einem Ionengradienten möglich ist. In der Phototrophie werden Elektronen aus Substraten mit niedrigem Redoxpotenzial zunächst energetisch angeregt, ehe sie oxidiert werden. Häufig kann dieser Mechanismus mit einem zyklischen Elektronentransport gekoppelt werden, wodurch keine Substratlimitierung eintritt. Neben der Phototrophie und der Gärung ist die Atmung die bekannteste und häufigste Form der Energiekonservierung. Bei der Atmung werden wiederum verschiedene Formen unterschieden. Abhängig davon ob Sauerstoff als Elektronenakzeptor dient, werden Aerobier von Anaerobiern unterschieden, wobei in der anaeroben Atmung eine größere metabolische Vielfalt zu finden ist. Als Elektronenakzeptoren können z.B. Nitrat, Nitrit, Sulfat, Eisen(III), Fumarat oder  $\text{CO}_2$  genutzt werden. Zusätzlich wird zwischen Organismen unterschieden, welche organische Kohlenstoffe als Elektronendonator nutzen (Organotrophe) und Organismen welche anorganische Substanzen oxidieren (Lithotrophe). Typische Substrate für Lithotrophe können Wasserstoff, Formiat, Eisen(II), Ammonium, sowie verschiedene reduzierte Schwefelspezies sein. Lithotrophe Organismen beziehen ihren Kohlenstoff für den Zellaufbau zumeist über  $\text{CO}_2$  und sind daher zugleich autotroph. Jedoch ist auch eine, als mixotrophe Lebensweise bezeichnete Mischform aus organoheterotrophem und lithoautotrophem Wachstum möglich (Fuchs *et al.*, 2017).

### 1.3.2 Extrazellulärer Elektronentransport (EET)

Als eine Sonderform der Atmung sind einige Mikroorganismen auch in der Lage unlösliche extrazelluläre Komponenten in eine Redoxreaktion einzubeziehen. Dieser Prozess wird als extrazellulärer Elektronentransport bezeichnet (EET) (Gralnick *et al.*, 2007).

Grundsätzlich kann ein EET in beide Richtungen stattfinden. Der Elektronentransport vom Zellinneren auf einen extrazellulären Elektronenakzeptor entspricht einer Form der anaeroben Atmung. Die umgekehrte Richtung, von einem unlöslichen Elektronendonator ins Zellinnere, stellt eine Form der Lithotrophie dar. Zuerst wurden solche Prozesse in metallreduzierenden Bakterien wie den Modellorganismen *Shewanella oneidensis* und *Geobacter sulfurreducens* beschrieben (Lovley *et al.*, 1988; Myers *et al.*, 1988). Als extrazelluläre Elektronenakzeptoren nutzen diese Bakterien in der Regel oxidierte Eisen- oder Mangan-Verbindungen. Die damit verbundene Eigenschaft Elektronen auch auf Elektroden zu übertragen zu können, wurde das erste Mal durch Kim *et al.*, (2002) beschrieben. Eine Kopplung des mikrobiellen Metabolismus mit elektrochemischen Systemen ist von besonderem Interesse, da Anwendungen wie Biosensoren, mikrobielle Brennstoffzellen und elektrisch gesteuerte Fermentationen möglich sind. Zusammengefasst werden solche Anwendungen als mikrobielle elektrochemische Technologien (MET) bezeichnet.

### **Mikrobielle Brennstoffzellen**

Unter allen METs sind die mikrobiellen Brennstoffzellen (microbial fuel cell - MFC) am weitesten entwickelt. Als Konzept zur Energiegewinnung werden bevorzugt stoffliche Abfallströme mit reduzierten, organischen Kohlenstoffverbindungen durch Mikroben oxidiert. Die Elektronen werden auf eine Anode abgegeben und an der Kathode werden diese wieder abiotisch auf einen Akzeptor transferiert. Abhängig vom eingestellten Potenzial und dem Elektronenakzeptor an der Kathode variiert die Spannung im System und die damit nutzbare Energie. Da Sauerstoff einen vergleichsweise hohes Standardredoxpotenzial besitzt ( $E^0$  +818 mV) werden bevorzugt Luftkathoden eingesetzt (Liu *et al.*, 2004). Eine Variation des Systems stellt die mikrobiellen Elektrolysezelle dar. An der Kathode wird ein Akzeptor reduziert, dessen reduziertes Produkt als Energieträger genutzt werden kann (z.B. H<sub>2</sub> oder CH<sub>4</sub>).

Die Produkte von MFC-basierten Prozessen besitzen in der Regel einen sehr geringen Marktwert und finden daher nur vereinzelt Anwendung. Dennoch besitzt diese Technologie einige Vorteile, welche in Pilotanlagen gezeigt werden konnten. Auf Grund des vergleichsweise simplen Aufbaus ergeben sich nur geringe Produktionskosten. In der Abwasserbehandlung kann der hohe chemische Energieeintrag genutzt werden um einen Teil des elektrischen Energiebedarfs der Anlage zu decken. Außerdem bieten MFCs an Orten ohne Zugang zu einer zentralen Stromversorgung, die Möglichkeit einer autarken elektrischen Energieversorgung (Tender *et al.*, 2008). Die coulombsche Effizienz dieser Prozesse ist meist sehr hoch, jedoch sind die elektrischen Energiedichten noch zu gering für eine wirtschaftliche Anwendung. Um diese zu steigern werden Unterschiede in EET-Ketten untersucht um limitierende Faktoren zu identifizieren (Krieg *et al.*, 2014; Beblawy *et al.*, 2020).



## Direkter Elektronentransport

Zentrales Element einer jeden MET stellt die Mikroben-Elektroden-Interaktion dar. Für anodische Kulturen sind die dahinter liegenden Mechanismen relativ gut erforscht (Shi *et al.*, 2016). Die Funktionsweise sowie limitierende Faktoren der Anodenatmung sind insbesondere für den Modellorganismus *Shewanella oneidensis* besonders gut beschrieben und sollen daher im Folgenden kurz gezeigt werden. Als Schlüsselement der EET-Kette fungieren in *S. oneidensis*, wie in den meisten exoelektrogenen Organismen, *c*-Typ Cytochrome. Diese Proteine lassen sich bereits anhand der Primärstruktur eines Proteins erkennen, da ein Porphyrin-Ring über ein Motiv aus zwei Cysteinen und einem Histidin gebunden wird (CxxCH). Komplextiert im Zentrum des Porphyrins befindet sich ein Eisenatom, welches durch verschiedene Redoxzustände (Fe(II) und Fe(III)) eine effiziente Elektronenaufnahme – und Abgabe ermöglicht. In *S. oneidensis* überspannt diese Elektronentransportkette ausgehend vom Chinon-Pool der inneren Membran, das Periplasma und die äußere Membran hin zum extrazellulären Raum. Ein Schema ist in Abb. 1.4 dargestellt.

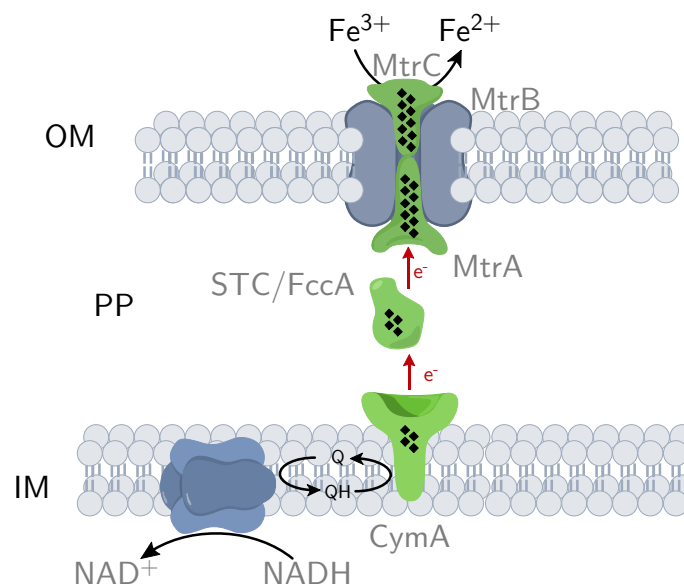


ABBILDUNG 1.4: Schematische Darstellung der extrazellulären Elektronentransportkette in *S. oneidensis*. *c*-Typ Cytochrome sind in Grün dargestellt, prosthetische Häm-Gruppen sind durch schwarze Rauten gekennzeichnet.

OM - äußere Membran, PP - Periplasma, IM - innere Membran.

Der EET startet an der inneren Membran, ausgehend von CymA, welches als membran-gebundenes Protein der NapC/NirT/NrfH-Familie die Elektronen aus dem Chinonpool an verschiedene Akzeptoren im Periplasma weitergeben kann. Eine Besonderheit dieses Cytochroms stellt das große Spektrum an Interaktionspartnern dar. Neben verschiedenen

terminalen Reduktasen (Schwalb *et al.*, 2003; Myers *et al.*, 2000) können Elektronen auch auf den Elektronencarrier STC übertragen werden, welches für den EET in der Lage Elektronen auf MtrA zu übertragen. Als Teil des MtrABC-Komplexes fungiert MtrA im äußeren Membrankomplex als Kontaktstelle zum Periplasma. Zum extrazellulären Raum erfüllt MtrC diese Rolle. Dieses fungiert als terminale Reduktase und kann Elektronen auf oxidierte Metallverbindungen oder eine Anode abgeben. Um den hydrophoben Bereich der Membran zu überbrücken, ermöglicht MtrB als Pore einen Kontakt zwischen MtrA und MtrC. Als einziges Protein im EET stellt das  $\beta$ -Fass Protein MtrB kein *c*-Typ Cytochrom dar. Eine funktionale, heterologe Expression des (größten) Proteins im EET stellt jedoch eine besondere Herausforderung dar (Myers *et al.*, 2002; Hartshorne *et al.*, 2009; Schicklberger *et al.*, 2011; Edwards *et al.*, 2020). Homologe zu diesem EET sind sowohl in *S. oneidensis* selbst (OmcA, MtrDEF, DmsEFA) als auch in weiteren Organismen bekannt (*Rhodoferrax ferrireducens*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Sideroxydans lithotrophicus* Zhong *et al.*, 2018). Dieser beschriebene Mechanismus wird als direkter Elektronentransport bezeichnet, da der Elektronenakzeptor in unmittelbarer Umgebung des äußeren Membrankomplexes vorkommt.

### Indirekter Elektronentransport

Als zusätzlichen Mechanismus eines indirekten Elektronentransports, exprimiert *S. oneidensis* Flavine, welche als Kofaktor an *c*-typ Cytochrome vorkommen und als Elektronenshuttle zwischen MtrC und der Anode diffundieren können (Von Canstein *et al.*, (2008)). Dieser indirekter EET ermöglicht gegenüber dem bisher beschriebenen Mechanismus theoretisch eine verringerte Oberflächenlimitierung des unlöslichen Elektronenakzeptors. Da in METs mit *S. oneidensis* lediglich Biofilmhöhen von wenigen Mikrometern erreicht werden, stellt der Elektronentransport über eine größere Distanz jedoch scheinbar ein Hindernis dar. Dem Gegenüber erreicht der zweite Modellorganismus für EET *Geobacter sulfurreducens* anodische Biofilme mit Höhen bis zu 70  $\mu\text{m}$ . Der Elektronentransport über diese Distanzen wird durch spezielle Zellfortsätze erreicht (Engel *et al.*, 2019).

Neben der Verwendung endogen produzierter Elektronenshuttles wie Flavinen und Phenazinen (Qiao *et al.*, 2017; Von Canstein *et al.*, 2008), können auch exogen bereitgestellte Shuttles genutzt werden. Neben natürlich vorkommenden Beispielen wie Huminstoffen können außerdem synthetische Substanzen eingesetzt werden.

Biotechnologisch ist dieser Ansatz attraktiv, da somit auch nicht EET-befähigte Organismen zu einer elektrodengestützten Atmung genutzt werden können und oberflächenlimitierte Umsatzraten gesteigert werden können. Jedoch sind die meisten synthetischen Shuttle auf Grund ihrer begrenzten Haltbarkeit, ihrer Toxizität und der erschwerten Produktaufreinigung eingeschränkt zum Einsatz geeignet (Watanabe *et al.*, 2009; Kaneko *et al.*, 2017; Paquete *et al.*, 2014; Harrington *et al.*, 2015).

## Heterologe Expression

Neben dem Einsatz exogener Elektronenshuttles existieren auch gentechnische Ansätze um nicht-exoelektrogene Mikroorganismen zum EET zu befähigen. Einen naheliegenden Ansatz stellt die heterologe Expression der Elektronentransportkette aus *S. oneidensis* im Modellorganismus *E. coli* dar.

Durch eine heterologe Expression kann neben dem großen Spektrum etablierter biotechnologischer Prozesse in *E. coli* auch eine genauere Charakterisierung und Optimierung des EETs erreicht werden. Durch die Isolation des notwendigen Minimalsets und dessen schrittweise Erweiterung können limitierende Faktoren identifiziert und optimiert werden. Zugleich bietet *E. coli* als vermutlich meist untersuchtes Bakterium eine hervorragende Plattform für die Untersuchung der einzelnen Komponenten und ihrer Interaktion. Insgesamt sind die beobachteten Umsatzraten im EET von *E. coli* selbst bei genetischer Optimierung jedoch mindestens 10x geringer als jene in *S. oneidensis* (Jensen *et al.*, 2016). Trotz weitgehender physiologischer Gemeinsamkeiten gibt es kritische Unterschiede, welche die heterologe Expression beeinflussen:

Für den Einbau von Hämgruppen und die Maturation von *c*-Typ Cytochromen dient in Prokaryoten das *c*-Typ Cytochrom Maturationssystem (*ccm*). Dieses besteht in *E. coli* aus den Genen *ccmABCDEFGH*. Für *E. coli* konnte während der heterologen Expression von *c*-typ Cytochromen jedoch eine unzureichende Maturation festgestellt werden, welche durch eine Überexpression der *ccm*-Gene gesteigert werden konnte (Thöny-Meyer *et al.*, 1995). Zusätzlich befinden sich die *ccm*-Gene im *S. oneidensis* in einer einzigartigen Anordnung. Diese lassen sich in 3 einzelne Operons unterteilen, wobei sich eine zweite Variante von *ccmF* in einem weiteren Operon findet. Eine verbesserte CymA-Maturation konnte in *E. coli* schon durch Modifikationen von *ccmH* gezeigt werden (Su *et al.*, 2020)

Ein korrekter Einbau äußerer Membran Cytochrome ist in *S. oneidensis* von einem funktionalen Typ-2 Sekretionssystem (T2SS) abhängig. Das *E. coli* eigene T2SS scheint jedoch unzureichend für eine funktionale Expression von MtrC. Ein Grund liegt vermutlich in der spezifischen Substraterkennung des T2SS, welche sich zum Teil auch zwischen nah verwandten Organismen unterscheidet (Sturm-Richter, 2014; Douzi *et al.*, 2012; Francetic *et al.*, 2000).

### 1.3.3 Extrazelluläre Elektronenaufnahme - EEA

Verglichen mit dem EET auf eine Anode bzw. auf unlösliche Elektronenakzeptoren, ist über Mechanismen des umgekehrten EET, um Elektronen von einer Kathode bzw. unlöslichen Elektronendonoren zu beziehen, weniger bekannt. In bioelektrochemischen Systemen konnte eine partielle Umkehrung des EETs in *S. oneidensis* und *G. sulfurreduces* gezeigt werden, welche zumindest teilweise auf die bekannten Mechanismen zurückgeführt werden kann (Dumas *et al.*, 2008; Rowe *et al.*, 2018). Jedoch sind homologe Gene zum EET aus *S. oneidensis* auch in Fe(II) oxidierenden Organismen wie *S. lithotrophicus* und *R. palustris* entdeckt worden. Obwohl einige Fe(II) Verbindungen durchaus gut in Wasser löslich sind, sind diese Eisenoxidierer auf einen EET angewiesen. Da die entstehenden Fe(III) Verbindungen unlöslich sind, würden sich bei einer intrazellulären Oxidation Agglomerate bilden, welche die Zellen schädigen. Durch die extrazelluläre Oxidation wird der Organismus nicht durch die schwerlöslichen Eisenverbindungen beeinträchtigt.

#### Neutrophile Eisenoxidation

*Sideroxydans lithotrophicus* ES-1 ist ein mesophiles, mikroaerobes Beta-Proteobakterium, welches aus verunreinigtem Grundwasser isoliert wurde. Neben Fe(II) ist dieses Bakterium auch zur Oxidation verschiedener Schwefelspezies befähigt. Für eine CO<sub>2</sub>-Assimilation kommt der CBB zum Einsatz und als Elektronendonator ausschließlich Sauerstoff. Der EET in *S. lithotrophicus* weist große Ähnlichkeit zum EET in *S. oneidensis* auf. In der äußeren Membran ist als  $\beta$ -Fass Protein MtoB eingelagert. Als Eisenoxidase fungiert MtoA, welches als Homolog zu MtrA Elektronen von Fe(II) an Proteine im Periplasma transferiert. Als Elektronenshuttle im Periplasma wurde das Monohäm MtoD identifiziert, welches mit einem ungewöhnlich hohem Redoxpotenzial (+155 mV vs. SHE) auffällt. Ebenfalls ungewöhnlich ist die Bindung einer einzelnen Hämgruppe, welche darüber hinaus in der Proteinstruktur besonders exponiert ist. Spekuliert wird daher auf spezielle Eigenschaften, welche eine Oxidation trotz des hohen Potenzials ermöglichen. In der inneren Membran ist ein Homolog zu CymA lokalisiert – CymA<sub>ES</sub>, welches als Elektronenakzeptor für MtoD postuliert ist. Zusätzlich ist ein Elektronentransport auf einen Cytochrom *bc1* Komplex und eine terminale Oxidase möglich (Emerson *et al.*, 1997; Emerson *et al.*, 2007; Beckwith *et al.*, 2015).

*Rhodospseudomonas palustris* TIE-1 ist ein Alpha-Proteobakterium, welches ebenfalls chemolithoautotroph wachsen kann, CO<sub>2</sub> über den CBB fixiert, und mit PioAB Homologe zu MtrAB besitzt. Als periplasmatisches Elektronenshuttle besitzt *R. palustris* ein *high-potential iron-sulfur protein* (HiPIP). Die Eisenoxidation in diesem Organismus ist jedoch an eine Form der Phototrophie gekoppelt. Mit Hilfe des Photosystems II erfolgt eine Energiekonservierung, unter anderem in Form eines Protonengradienten entlang der Cytoplasmamembran.

Für die Reduktion von  $\text{NAD}^+$  ist jedoch ein zusätzlicher Elektronendonator notwendig. Bei fehlenden Alternativen kann *R. palustris* Elektronen von  $\text{Fe(II)}$  in einem reversen Elektronentransport unter Abbau des Protonengradienten beziehen. Durch diese Photoferrotrophie genannte Form des Metabolismus ist eine Nutzung von  $\text{CO}_2$  als einzigem Elektronenakzeptor möglich (Jiao *et al.*, 2007).

### Acidophile Eisenoxidation

Ein weiterer detailliert beschriebener EEA-Mechanismus ist für die acidophile Eisenoxidation im Modellorganismus *Acidithiobacillus ferrooxidans* beschrieben. *A. ferrooxidans* gilt als das meist untersuchteste, extrem acidophile Bakterium und ist vor allem durch die mikrobiell induzierte Versauerung von Grubengewässern bekannt. Der postulierte EEA-Mechanismus verläuft dabei über das *c*-Typ Cytochrom Cyc2, ein äußeres Membran-Dihäm-Cytochrom. Als periplasmatische Elektronenshuttle sind ein Rusticyanin und zwei weitere Dihäm-Cytochrome (Cyc1 und CycA) postuliert. In der inneren Membran vermittelt eine Cyc1 oxidierende *aa3* Cytochrom-Oxidase den Aufbau eines Protonengradienten. Dieser wird im Anschluss entweder für die Generation von ATP oder für Reduktion des Chinonpools in der inneren Membran ausgehend von CycA und anschließender Reduktion von  $\text{NAD}^+$  genutzt (Quatrini *et al.*, 2006; Zhan *et al.*, 2019). Homologe Gene wurden in einigen *Leptospirillum* Arten und im neutrophilen Bakterium *Mariprofundus ferrooxydans* gefunden (Gupta *et al.*, 2020).

Eine schematische Darstellung der Elektronentransportketten in diesen drei Organismen ist in Abbildung 1.6 gezeigt.

Zwei weitere, nicht homologe Eisenoxidationswege sind aufgrund von Transkriptomanalysen postuliert und werden durch Fox-Gen Cluster kodiert. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch kaum bekannt, daher soll hier nur kurz darauf eingegangen werden. In *Rhodospirillum rubrum* findet sich das Cluster *foxEYZ*. *foxE* kodiert für ein *c*-Typ Cytochrom, welches ebenso wie FoxY im Periplasma lokalisiert ist. Beide werden sowohl während einer Eisen- als auch Wasserstoffoxidation exprimiert, während FoxZ, ein Protein mit unbekannter Transportfunktion, nur während der Eisenoxidation exprimiert wird (Croal *et al.*, 2007). In *Sulfolobus metallicus* wurde das *foxGHIJEFABCD* Cluster entdeckt, welches unter anderem für kupferhaltige Proteine, ein Eisen-Schwefel-Protein, ein Cytochrom *b*, eine terminale Oxidase sowie ein Cytochrome *bc1*-Komplex kodiert (Bathe *et al.*, 2007).

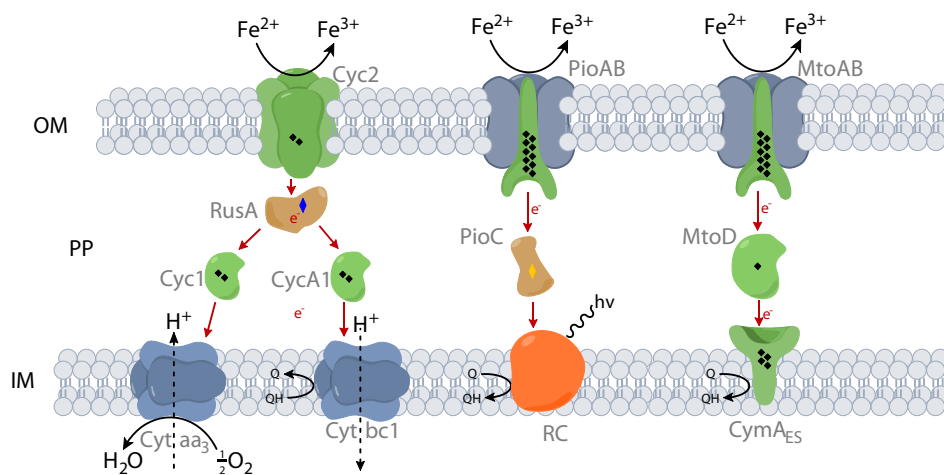


ABBILDUNG 1.5: Schematische Darstellung extrazellulärer Elektronenaufnahme Mechanismen in den Fe(II)-oxidierenden Organismen *A. ferrooxidans* (links), *R. palustris* (Mitte) & *S. lithotrophicus* (rechts). C-Typ Cytochrome sind in grün dargestellt, Häm-Gruppen sind durch eine schwarze Raute indiziert, Eisen-Schwefel-Cluster durch eine gelbe Raute, ein Kupfer-Kofaktor durch eine blaue Raute. Das Photosystem aus *R. palustris* ist in orange dargestellt. OM - äußere Membran, PP - Periplasma, IM - Innere Membran.

### Indirekte EEA

Neben einem direkten Elektronentransfer ist auch eine Elektronenshuttle-vermittelte Elektronenaufnahme denkbar. Allerdings wurden bisher erst wenige solcher Systeme beschrieben. Als Beispiel für ein endogenes Shuttle, ist für das heterotroph wachsende *Clostridium acetobutylicum* die Sekretion von Flavinen während einer kathodischen Fermentation beschrieben (Engel *et al.*, 2018). Eine indirekte Elektronenaufnahme von einem unlöslichen Elektronendonator ist ebenfalls über Wasserstoff oder Formiat möglich und wurde sowohl an Kathoden als auch für Eisen(0)-oxidierende Organismen postuliert (Lohner *et al.*, 2014; Deutzmann *et al.*, 2015; Dinh *et al.*, 2004). Eine schematische Übersicht potenzieller EEA-Mechanismen ist in Abb. 1.6 dargestellt.

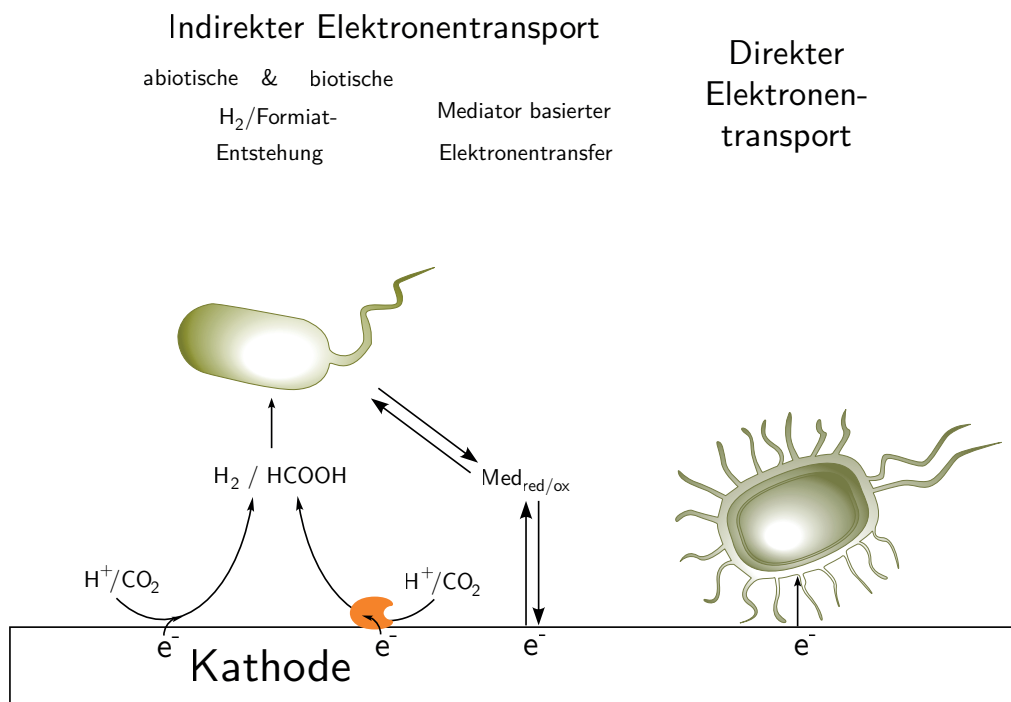


ABBILDUNG 1.6: Schematische Darstellung der extrazellulären Elektronenaufnahme Mechanismen von einer Kathode. Es werden drei verschiedene indirekte Elektronenaufnahmemechanismen unterschieden: über die abiotische Wasserstoff- bzw. Formiatproduktion, eine enzymatisch katalysierte Wasserstoff- bzw. Formiatproduktion, ein mediatorvermittelter Elektronentransport, bspw. mit Phenazinen. Ein direkter Elektronentransport verläuft direkt über membrangebundene Proteine, welche ebenfalls an Zellfortsätzen vorkommen können.

## 1.4 Stand der Forschung - elektrotrophe Organismen

Obwohl eine direkte Elektronenaufnahme von einer Kathode in autotrophen Mikroorganismen experimentell nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte, wird dieser meist aufgrund sekundärer Beobachtungen postuliert. Ein biologisch katalysierter Strom oder die Reduktion eines Elektronenakzeptors werden als indirekter Nachweis einer katabolen Aktivität angeführt. Diese kathodischen Reaktionen lassen sich jedoch zum Teil auch ohne mikrobielle Aktivität erklären, wie unter anderem Versuche mit *Spent*-medium entsprechender Kulturen zeigen (Deutzmann *et al.*, 2015). Im Unterschied dazu ist auch ein Nachweis des Anabolismus in Form von Wachstum möglich. Dies erfolgt entweder durch den Nachweis einer CO<sub>2</sub>-Reduktion oder durch eine Zunahme der Biomasse.

Seit der ersten Beschreibung im bioelektrochemischen System (Nevin *et al.*, 2010) wurden durch gezielte bioelektrochemische Charakterisierung von Reinkulturen und Anreicherungen aus Umweltproben mehrere potenziell elektrotrophe Organismen entdeckt. Eine Zusammenstellung ist in Abbildung 1.7 dargestellt. Eine kathodische Aktivität findet sich dabei in sehr diversen phylogenetischen Gruppen wie den Euryarchaeota, Firmicutes und den Proteobakterien. Auch unter der Betrachtung verschiedener ökologischer Nischen, sind Elektrotrophe divers vertreten. Neben einigen Mesophilen, finden sich auch acidophile, marine, phototrophe und thermophile Vertreter. Als CO<sub>2</sub>-Fixierungswege wurden sowohl der WL-Weg, der CBB-Zyklus als auch der rTCA-Zyklus beschrieben (s. Abbildung 1.7).

### 1.4.1 Hydrogenotrophe

#### Acetogene & Methanogene

Bei einem Versuch einer physiologischen Unterteilung ist auffällig, dass vorwiegend hydrogenotrophe Organismen und darunter insbesondere Acetogene in MES auftauchen. So wurden mehreren Spezies der Genera *Sporomusa*, *Clostridium* und *Moorella* die Befähigung zur Elektroautotrophie zugesprochen. Als ungewöhnliche Besonderheit unter diesen grampositiven Organismen besitzen *Sporomusa*-Arten als Teil der Familie der Negativicutes eine abgewandelte Form eines Periplasmas (Antunes *et al.*, 2016). Ein direkter Elektronentransport müsste daher ähnlich wie in gram-negativen Exoelektrogenen eine zusätzliche Membran überbrücken. In diesem Zusammenhang ist ebenfalls auffällig das in *Sporomusa*- und *Moorella* Spezies Gene für *c*-Typ Cytochrome identifiziert wurden (Philips, 2020).

Neben Acetogenen sind auch vier Methanogene auf Kathoden beschrieben worden. Darunter das marine Archaeon *Methanococcus maripaludis* und das thermophile Archaeon *Methanothermobacter thermoautotrophicus*. Diese besitzen allerdings keine Cytochrome. Diese finden sich unter Methanogenen ausschließlich in der Ordnung der Methanosarcinales, welche bisher nicht auf Kathoden beschrieben wurden. Jedoch sind Methanosarcinales für



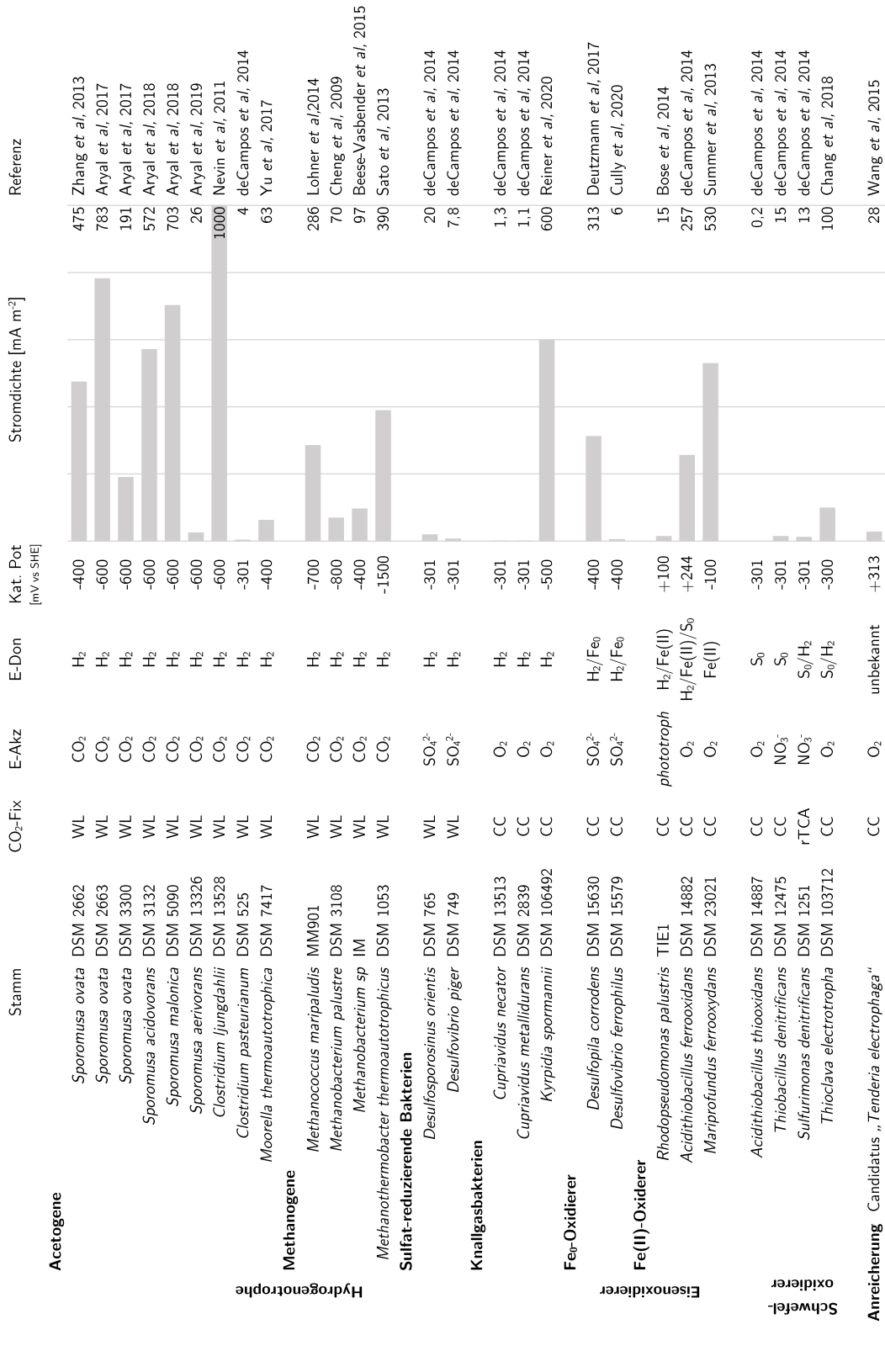


ABBILDUNG 1.7: Übersicht über an Kathoden aktiven Mikroorganismen eingeteilt in physiologische Gruppen. Dargestellt sind zusätzlich der mittlere Stromverbrauch, das angelegte Potenzial, beschriebene CO<sub>2</sub>-Fixierungswege der Organismen, der eingesetzte Elektronenakzeptor, sowie potenzielle nutzbare Elektronendonoren.

ihre extrazellulären Elektronenaufnahme während einer Co-Kultivierung mit *Geobacter* Spezies bekannt. Dieser direkte Interspezies Elektronentransport konnte zwar mit membranständigen *c*-Typ Cytochromen in Verbindung gebracht werden (Holmes *et al.*, 2019), kürzlich konnte dieser jedoch auch unabhängig davon gezeigt (Yee *et al.*, 2020).

Ausgehend von den Potenzialen in diesen Systemen, welche knapp über dem berechneten Standardredoxpotenzial für eine Wasserstoffentstehung liegen (-421 mV vs. SHE), wurden dEET-Mechanismen postuliert. Wie in Philips (2020) beschrieben, reichen die Potenziale der meisten MES jedoch auch für eine abiotische Wasserstoffentstehung aus, wenn der Wasserstoffpartialdruck gering gehalten wird. Allerdings ist das Potenzial neben einer Enzym-spezifischen Affinität und Umsatzrate des Wasserstoffs unter anderem auch von der Biofilm-Bedeckung der Kathode und dem lokalen pH-Wert abhängig. Wahrscheinlicher ist daher, dass in den meisten dieser Systeme ein Wasserstoff-basierter Elektronentransport stattfindet. Eine enzymatisch katalysierte Wasserstoffentstehung kann dabei jedoch nicht ausgeschlossen werden. Ebenfalls ist eine simultane Existenz mit anderen Mechanismen denkbar. Eine Deletion der Hydrogenase in *M. maripaludis* führte zu einer drastischen Senkung des Elektronentransports auf ca 10% verglichen mit dem Wildtyp (Lohner *et al.*, 2014). Diese Restaktivität konnte in einer weiteren Arbeit konnte auf eine Formiat-Dehydrogenase zurückgeführt werden, welche zugleich in Versuchen mit Zellüberstand eine zellfreie Formiatproduktion ermöglichte (Deutzmann *et al.*, 2015). Die Existenz von *c*-Typ Cytochromen in *Moorella* und *Sporomusa* deutet darüberhinaus auf verschiedene simultane Mechanismen hin, welche laut Philips (2020) weiterer Untersuchung bedarf.

### **Sulfatreduzierer und Knallgasbakterien**

Eine Wasserstoffproduktion wurde auch an einer Biokathode mit dem Sulfatreduzierer *Desulfovibrio paqueseii* bei einem Potenzial von -900 mV (vs. SHE) beobachtet (Aulenta *et al.*, 2012). Basierend darauf erfolgte die Beobachtung einer elektrochemischen Katalyse in den sulfatreduzierenden Bakterien *D. piger* und *D. orientis*.

Als einzige hydrogenotrophe Organismen, welche nicht den WL-Weg zur CO<sub>2</sub>-Fixierung nutzen, wurden auch die Knallgasbakterien *C. necator*, *C. metallicus* und *K. spormannii* auf einer Kathode charakterisiert. Die hierfür verwendeten oxischen Medien führen durch eine abiotische Reduktion des Sauerstoffs zu einem Hintergrundstrom. Daher ist eine alleinige Messung der Stromdichten in diesen Systemen nicht aussagekräftig. *Cupriavidus* Spezies zeigen bei der Kultivierung auf Kathoden nur eine sehr geringe Aktivität und werden daher als nicht Elektrotroph betrachtet (Campos Rodrigues *et al.*, 2014). Für *Kyrpidia spormannii* hingegen - ein thermoacidophiles, strikt aerobes, gram positives Bakterium - konnte Wachstum auf einer Kathode mittels optischer Kohärenztopographie beobachtet werden (Reiner *et al.*, 2020).

Es werden Biofilmdicken bis zu 100 µm erreicht, dies legt einen indirekten Elektronentransport über Wasserstoff nahe. Ein verminderter Strom bei erhöhter Substratbedeckung kann in diesem Fall auf eine verminderte Reduktion von Sauerstoff zurückgeführt werden. Durch eine Adaption dieses Stamms, bei der unter anderem eine Mutation einer Heterodisulfidreduktase auftritt, konnte jedoch auch eine Oxidation von Schwefel, sowie ein verbessertes Biofilmwachstum beobachtet werden. Ein simultaner Wasserstoff-vermittelter und direkter EEA Mechanismus wurden daher auch in diesem Organismus postuliert (Jung *et al.*, 2021).

## 1.4.2 Eisen- und Schwefeloxidierer

### Eisenoxidierer

Eine gezielte mikrobiell katalysierte Wasserstoffproduktion konnte im eisenoxidierenden Sulfatreduzierer *Desulfopila corrodens* IS4 mit einer coulombschen Effizienz von 100% gezeigt werden. In einer gezielten Co-Kultur mit *M. maripaludis* bzw. *Acetobacterium woodii* sind damit die bisher höchsten kathodischen Umsatzraten erreicht worden (Deutzmann *et al.*, 2017). Spektroelektrochemische Analysen deuten auf einen direkten EET über *c*-Typ Cytochrome an der Zelloberfläche hin (Beese-Vasbender *et al.*, 2015). *Desulfovibrio ferrophilus* IS5 wurde zeitgleich mit *D. corrodens* isoliert (Dinh *et al.*, 2004) und zeigt ebenfalls eine kathodische Sulfatreduktion. Ein Hydrogenase-abhängiger EEA ist wahrscheinlich (McCully *et al.*, 2020).

Im Gegensatz zu *D. corrodens* und *D. ferrophilus*, welche elementares Eisen oxidieren, sind auf Kathoden auch Organismen beschrieben, welche Fe(II) oxidieren. Darunter das bereits erwähnte phototrophe Bakterium *R. palustris*, welches das *pio*-Cluster zur Eisenoxidation nutzt. Als nicht Phototrophe sind *A. ferrooxidans* und *M. ferrooxydans* in der Lage, Fe(II) zusammen mit Sauerstoff als alleinige Energiequelle zu nutzen. Für den EET finden sich in diesen beiden Organismen trotz phylogenetischer Distanz eine Vielzahl von homologen *c*-Typ Cytochromen, welche für einen EET postuliert sind. *A. ferrooxidans* zeigt dabei eine erstaunliche Vielfalt an verwertbaren Elektronendonoren und -akzeptoren (McAllister *et al.*, 2019; Quatrini *et al.*, 2006). Im BES kann Wachstum schon bei vergleichsweise hohen Potenzialen beobachtet werden (+ 244 mv vs. SHE), welche einen Wasserstoff-vermittelten EET unwahrscheinlich machen. Als einzige Reinkultur wurde für diesen Organismus Wachstum bei so hohen Potenzialen gezeigt.

## Schwefeloxidierer

Das nah verwandte Bakterium *A. thiooxidans* ist metabolisch lediglich auf die Oxidation von elementarem Schwefel mit Sauerstoff limitiert und zeigt eine geringere Performance wie *A. ferrooxidans*. Ebenso wie *T. denitrificans*, welches jedoch Nitrat als Elektronenakzeptor nutzt, sind die zugrundeliegenden Mechanismen jedoch noch weitgehend ungeklärt. Da diese beiden Organismen nicht hydrogenotroph sind, kann im Gegensatz zu *S. denitrificans* und *T. electrophaga* ein Wasserstoff-basierter Elektronentransport ausgeschlossen werden. *S. denitrificans* ist jedoch zugleich der einzige Organismus in MES der den rTCA nutzt.

### 1.4.3 Anreicherungskulturen

Eine marine Anreicherungskultur, welche nach den meist abundanten Organismen darin benannt wurde (Marinobacter-Chromatiaceae-Labrenzia - MCL) fällt durch autotrophes Wachstum auf einer Kathode mit einem angelegten Potenzial von +303 mV und +470 mV (vs. SHE) auf. Der Biofilm wächst aerob auf 20 µm Höhe. Der Hauptvertreter mit 70% Abundanz in dieser Anreicherung, *Candidatus Tenderia electrophaga* gehört zur Familie der Chromatiaceae und besitzt einige Gene für c-Typ Cytochrome. Durch Metatranskriptomanalysen sind darunter Homologe zu Cyc2, Cyc1 aus *A. ferrooxidans* und MtoD aus *S. lithotrophicus* für einen EEA identifiziert. Das Wachstum bei diesem hohen Potenzial, sowie die homologen Gene legen einen EEA nahe, welcher typisch für Eisenoxidierer ist. Neben der Kathode ist noch kein weiterer Elektronendonator identifiziert, welchen dieser Organismus nutzen kann (Wang *et al.*, 2015; Eddie *et al.*, 2017).

Eine thermoacidophile Anreicherungskultur, ausgehend von geothermalen Quellen der Azoren, zeigte nach mehreren Monaten noch eine sehr hohe Diversität. Daraus konnte unter anderem *K. spormannii* isoliert werden. Hauptvertreter in dieser Anreicherung stellen jedoch die Bakterien des Genus *Moorella*, *Desulfofundulus* und *Thermodesulfatimonas*, sowie Archaea der Familien Sulfolobaceae und Thermoplasmataceae dar. Damit sind erstmalig nicht-methanogene Archaea auf einer Kathode beschrieben. Jedoch fällt zugleich auf, dass die meisten Bakterien und Archaea in dieser Anreicherung hydrogenotroph sind. Darunter befindet sich das bisher einzige thermophile, in Reinkultur auf einer Kathode beschriebene Bakterium *M. thermoacetica*. Beim einzigen Genus im Metagenom für das keine hydrogenotrophen Arten bekannt sind, handelt es sich um *Sulfolobus*. Einzelne *Sulfolobus* Spezies sind jedoch zur Eisen- und Schwefeloxidation befähigt (Reiner *et al.*, 2020).

## 1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Potenzial der Elektrosynthese kann aktuell aufgrund der nicht verstandenen Mechanismen des EEA nicht vollständig ausgeschöpft werden. Wahrscheinlich basiert der EEA der meisten elektrotrophen Mikroorganismen auf einem Wasserstoff-vermittelten Elektronenfluss. Um die Möglichkeiten der Elektrosynthese ausschöpfen zu können ist jedoch ein Verständnis der Mikrogen-Elektroden Interaktion von entscheidender Bedeutung. Dafür bietet die Charakterisierung direkter Elektronentransportwege analog zu den Mechanismen in anodischen Mikroorganismen den vielversprechendsten Ausgangspunkt. Ziel dieser Arbeit war daher die Suche und Identifikation von Schlüsselementen im direkten Elektronentransportweg von elektrotrophen Organismen. Die Ziele dieser Arbeit sind zwei übergeordneten Zielen untergliedert.

Zum einen sollte eine Methodik entwickelt werden, durch welche kritische Elemente im extrazellulären Elektronentransport schnell identifiziert werden können. Der Fokus lag in diesem Fall auf einer Etablierung eines heterologen Expressionsystems, welches durch einen breit gefächerten Ansatz diesen Elektronentransport in einem nahezu beliebigen mesophilen Organismus ermöglichen sollte. Da viele homologe Varianten des Porin-Cytochrom-Komplex basierten Systems bekannt sind, wurden verschiedene Genvarianten der einzelnen Module gleichzeitig, zufällig aber gezielt kombiniert und simultan in einen angepassten Vektor kloniert.

Das zweite Ziel dieser Arbeit widmete sich der Entdeckung neuer, unbekannter Elektronentransportmechanismen an einer Kathode. Wiederum lag der Fokus auf einem direkten Elektronentransport. Zunächst wurde dafür eine Anreicherungskultur aus Umweltbodenproben durch Sequenzanalysen untersucht. Durch genetische Unterschiede zwischen Bodenproben und einer kathodischen Anreicherung sollten elektrotrophe Spezies entdeckt werden und potenzielle Schlüsselgene identifiziert werden.

Schließlich wurde auf Grund bisheriger Erkenntnisse ein nicht-hydrogenotropher Modellorganismus für eine elektrotrophe Charakterisierung ausgewählt. *Sulfolobus acidocaldarius* besitzt dabei keine Gene welche für einen Elektronentransportmechanismus beschrieben sind. Zugleich bietet es als hyperthermophiles Modell-Archaeon mit existierendem genetischen System eine vielversprechende Plattform für eine biotechnologische Applikation.

## Kapitel 2

# Material und Methoden

## 2.1 Verwendete Mikroorganismen und Chemikalien

### Chemikalien

Sämtliche verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von VWR (Bruchsal), Merck (Darmstadt), Promega (Mannheim), Beckman Coulter (Krefeld), Appli-chem (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma Aldrich (München). Enzyme wurden von New England Biolabs (Frankfurt am Main) bezogen. Gase von TiG (Mannheim).

### Verwendete Stämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme sind in Tabelle 2.1 aufgelistet.

TABELLE 2.1: In dieser Arbeit verwendete Stämme mit relevantem Genotyp und Erstbeschreibung.

Stamm	relev. Genotyp	Referenz
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i> 98-3	WT	(Brock <i>et al.</i> , 1972)
<i>Escherichia coli</i> DH10B	araD139	(Lutz <i>et al.</i> , 1997)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> InvSc1	ura3-52	(Invitrogen)
<i>Escherichia coli</i> WM3064	$\Delta$ dapA::[erm pir]	(W. Metcalf, Illinois)
<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	WT	(Venkateswaran <i>et al.</i> , 1999)
<i>S. oneidensis</i> $\Delta\Delta$	$\Delta$ fccA $\Delta$ stc	Sturm, 2014
<i>S. oneidensis</i> $\Delta\Delta\Delta$	$\Delta$ cymA $\Delta$ stc $\Delta$ fccA	Diese Arbeit
<i>S. oneidensis</i> $\Delta$ EET	$\Delta$ cymA $\Delta$ stc	Diese Arbeit
	$\Delta$ fccA $\Delta$ mtrAB	
<i>Cupriavidus necator</i> H16	WT	(Makkar <i>et al.</i> , 1987)

## Plasmide

Sämtliche für diese Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2.2 aufgeführt. Es kamen Resistenzgene für Gentamycin ( $\text{Gen}^R$ ), Kanamycin ( $\text{Kan}^R$ ), Ampicillin ( $\text{Amp}^R$ ) und Chloramphenicol ( $\text{Chl}^R$ ) zum Einsatz:

TABELLE 2.2: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

Plasmid	relevanter Genotyp	Referenz
pEC86_ccm <sub>Eco</sub>	$\text{Chl}^R$ , $P_{\text{tet}}\text{ccm}A\text{-}H$	Thöny-Meyer <i>et al.</i> , 1995
pHCA	$\text{Kan}^R$ , <i>ura3</i> , Ori <sub>BBR</sub> , Ori <sub>2<math>\mu</math>m</sub>	Diese Arbeit
pHCA_c27*	$\text{Kan}^R$ , <i>ura3</i> , Ori <sub>BBR</sub> , Ori <sub>2<math>\mu</math>m</sub> , <i>mtrAB</i> , <i>mtaABD</i> , <i>pioABC</i> , <i>stc</i> , <i>cymA</i> , <i>cymA<sub>ES</sub></i> , <i>napC</i>	Diese Arbeit
pIND4_mtrAB <sub>S</sub>	$\text{Kan}^R$ , $P_{\text{Ara}}\text{mtrAB}_S$	Golitsch, 2016
pIND4_pioABC	$\text{Kan}^R$ , $P_{\text{Ara}}\text{pioABC}$	Golitsch, 2016
pT7blue3	$\text{Amp}^R$ , $P_{\text{Ara}}\text{lacZ}$	Novagen

\* bezieht sich auf ein Set aus bis zu 27 Plasmiden, welche in Abs. 3.1.2 beschrieben sind.

### 2.1.1 Stammkultivierung und -erhaltung

Die Kultivierung sämtlicher Bakterien-Stämme erfolgte unter ständigem Schütteln (130 rpm) bei 30 °C bzw. 37 °C (*E. coli*) in Lysogeny-broth-Medium nach Miller, 1972. Zur Kulturerhaltung und Vereinzelnung wurde auf 2 %-igen Agar-Platten ausgestrichen und in einem Brutschrank kultiviert. Als Selektionsmarker dienten bei Bedarf Antibiotika, wie in Tabelle 2.2 beschrieben in Konzentrationen von 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Ampicillin), 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Kanamycin), 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Chloramphenicol) und 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Gentamycin). Die Kultivierung von *S. cerevisiae* erfolgte entsprechend in YPD-Medium bei 30 °C. Für das Erstellen kompetenter *E. coli* Zellen kamen weiterhin SOB- und SOC-Medium zum Einsatz. Auch hierbei wurden die Zellen bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Rezepte für sämtliche Medien finden sich in Tab. 2.3.

### 2.1.2 Anoxische Kultivierung von *S. oneidensis* und *E. coli*

Für die anoxische Kultivierung von *S. oneidensis* wurde M4-Minimalmedium mit Na-*D,L*-Laktat als Kohlenstoffquelle und Elektronendonator, und Eisen(III)-Citrat als Elektronenakzeptor genutzt. Die Inkubation erfolgte dabei ebenfalls schüttelnd bei 30 °C. Die Zusammensetzung des M4-Minimalmediums ist in Tabelle 2.5 beschrieben.

Die anoxische Kultivierung von *E. coli* erfolgte in M9-Minimalmedium mit Glycerin als Kohlenstoffquelle und Elektronendonator. Als Elektronenakzeptor diente in diesem Fall Eisen(III)-nitrioloessigsäure (Fe-NTA). Die Inkubation erfolgte schüttelnd bei 37 °C. Die Zusammensetzung des M9-Minimalmediums ist in Tabelle 2.5 beschrieben.

### Fe(II)-Bestimmung

Während der anoxischen Kultivierung, konnte die Verfügbarkeit des Elektronenakzeptors (Fe(III)) indirekt mithilfe eines Ferrozinassays verfolgt werden (Stookey, 1970). Ferrozin (Dinatrium-4-[3-pyridin-2-yl-6-(4-sulfonatophenyl)-1,2,4-triazin-5-yl]benzoesulfonat) und Fe(II) Ionen bilden einen purpurnen Komplex, welcher ein Absorptionsmaximum zwischen 550 und 600 nm besitzt. 100 µl einer Zellsuspension wurden sofort nach Entnahme aus anoxischen Flaschen in 900 µl 1 M HCl angesäuert. Dies verhindert die Reoxidation des Eisens mit Luftsauerstoff. 20 µl dieser Probe wurden mit 180 µl Ferrozin-Lösung (0,1 % (w/v) Ferrozin in 50 % (w/v) Ammoniumacetat) versetzt und die Absorption bei 595 nm bestimmt. Die Fe(II) Konzentration wurde anhand einer  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{II})(\text{SO}_4)_2$  Eichgerade bestimmt.

### Cryokonservierung

Für eine Konservierung der Stämme wurden Cryokulturen angefertigt. Dafür wurde ein Milliliter einer Zellkultur in der exponentiellen Wachstumsphase mit 200 µl Glycerin gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgt anschließend bei -80 °C.

TABELLE 2.3: Zusammensetzung YPD-, LB-, SOB- und SOC-Medium.  
Einwaage je 1 L.

Substanz	YPD	LB	SOB	SOC
Pepton	20 g			
Trypton		10 g	20 g	20 g
Hefeextrakt	10 g	5 g	5 g	5 g
NaCl		5 g	0,58 g	0,58 g
KCl			0,19 g	0,19 g
MgCl <sub>2</sub>				1,9 g
Glukose	20 g			1,44 g



TABELLE 2.4: Zusammensetzung des M4-Minimalmediums.

Substanz	Einwaage für 1 L	Konzentration
$K_2HPO_4$	221 mg	1,27 mM
$KH_2PO_4$	99 mg	730 $\mu$ M
HEPES	1,4 g	5 mM
$NaHCO_3$	168 mg	2 mM
$(NH_4)_2SO_4$	1,19 g	9 mM
NaCl	8,7 g	150 mM
$MgSO_4 \times 7 H_2O$	250 mg	1 mM
$CaCl_2$	11 mg	0,1 mM
Spurenelemente (100X, Tab. 2.6)	10 ml	

TABELLE 2.5: Zusammensetzung des M9-Minimalmediums.

Substanz	Einwaage für 1 L	Konzentration
$K_2HPO_4$	12,8 g	48 mM
$KH_2PO_4$	3 g	22 mM
$NH_4Cl$	1 g	19 mM
NaCl	0,5 g	8,5 mM
$MgSO_4 \times 7 H_2O$	250 mg	1 mM
$CaCl_2$	11 mg	0,1 mM
Spurenelemente (100X, Tab. 2.6)	10 ml	

TABELLE 2.6: Zusammensetzung 100x Spurenelemente für M4 und M9.

Substanz	Einwaage für 1 L	Konzentration
$CoCl_2 \times 6 H_2O$	119 mg	500 $\mu$ M
$CuSO_4 \times 5 H_2O$	5 mg	20 $\mu$ M
$FeCl_2 \times 4 H_2O$	107,4mg	540 $\mu$ M
$H_3BO_3$	351 mg	5,7 mM
$MnSO_4 \times H_2O$	21,3 mg	130 $\mu$ M
$Na_2EDTA \times 2 H_2O$	2,5 g	6,7 mM
$Na_2MoO_4 \times 2 H_2O$	93,6 mg	390 $\mu$ M
$Na_2SeO_4$	28,3 mg	150 $\mu$ M
NaCl	58,4 mg	1 mM
$NiCl_2 \times 6 H_2O$	119 mg	500 $\mu$ M
$ZnSO_4 \times 7 H_2O$	30 mg	100 $\mu$ M

TABELLE 2.7: Zusammensetzung des M88-Mediums.

Substanz	Einwaage für 1 L	Konzentration
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,3 g	10 mM
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	280 mg	2,8 mM
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	250 mg	1 mM
$\text{CaCl}_2$	70 mg	0,6 mM
$\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	20 mg	0,1 mM
Allen's Spurenelemente (Tab. 2.8)	10 ml	

TABELLE 2.8: Zusammensetzung Allen's Spurenelemente.

Substanz	Einwaage für 1 L	Konzentration
$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$	180 mg	1 mM
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$	450 mg	2,2 mM
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	22 mg	77 $\mu\text{M}$
$\text{CuCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	5 mg	29 $\mu\text{M}$
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	3 mg	12,4 $\mu\text{M}$
$\text{VOSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	3 mg	16,6 $\mu\text{M}$
$\text{CoSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$	1 mg	4 $\mu\text{M}$

### 2.1.3 Kultivierung in bioelektrochemischen Systemen

Die heterotrophe Anzucht von *Sulfolobus acidocaldarius* erfolgte in M88-Medium (Tabelle 2.7) mit 0,2 % Dextrin und 0,1 % Hefeextrakt, schüttelnd bei 60 °C.

Die elektroautotrophe Kultivierung von *Sulfolobus acidocaldarius* erfolgte in dieser Arbeit in zwei Systemen. Beide Systeme sind sogenannte ein-Kammer-Aufbauten, in denen die Arbeitselektrode als Kathode fungiert. Als Referenz dient eine Ag/AgCl-Bezugs-Elektrode der Firma Meinsberger (Waldheim). Mit Hilfe eines Potentiostaten der Firma Gamry (Warminster, PA, USA) wurde ein Potenzial von -350 mV (vs. SHE) angelegt. Dies entspricht einem Potenzial von -549 mV gegenüber der verwendeten Ag/AgCl-Referenzelektrode. Die resultierende Stromstärke wurde in einem Intervall von 5 min über 14-15 Tage regelmäßig gemessen und aufgezeichnet. Die Reaktoren wurden zunächst separat zum M88-Medium ohne Kohlenstoffquellen autoklaviert, die Referenzelektrode wurde durch eine UV-Bestrahlung sterilisiert, bevor diese eingesetzt und das Medium beimpft wurde. Als Substrat wurde ein Gasgemisch aus  $\text{CO}_2$  und  $\text{O}_2$  im Verhältnis 99,5:0,5 verwendet. Die Inkubation erfolgte konstant bei 60 °C.

### **Mikrobieller Elektrosynthesereaktor**

Ein Elektrosynthesereaktor entsprechend dem Design von Golitsch, 2016 ist schematisch in Abbildung 2.1 dargestellt. In diesem Aufbau besteht die Kathode aus einem Graphitvlies der Firma SGRATHERM (SGL Group aus Wiesbaden) mit einer Dicke von 1 mm und einer Oberfläche von 16 cm<sup>2</sup>. Das Vlies wird in einem Polycarbonat-Rahmen eingespannt, sodass eine Seite des Vlies in Kontakt zum Medium steht. Für den Einsatz im Reaktor wurde das Vlies mit Isopropanol vorbehandelt um es benetzbar zu machen. Die Gegenelektrode besteht aus einem 5 cm<sup>2</sup> großen Platinnetz (Chempur, Karlsruhe). Dieses befindet sich in einer Glasfritte mit einer Porengröße von 1-1,6 µm von Robuglas (Hattert), um einen Austausch von Elektrolyten zu gewährleisten und gleichzeitig einen direkten Kontakt von Mikroorganismen mit der Anode zu verhindern. Die Begasung erfolgte kontinuierlich durch eine Glasfritte, und einem Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm von Filtropur (Sarstedt).

### **Fließzellperipherie**

Das zweite, in dieser Arbeit verwendete System für eine elektrotrophe Kultivierung entstammt dem Design von Hackbarth *et al.*, 2020 und ist in Abb. 2.2 dargestellt. Der Aufbau dieser Fließzelle, mit zugehöriger Peripherie ermöglichte eine Kultivierung extremophiler Organismen. Die Materialien wurden dabei Temperatur-, Druck- und Säurebeständig gewählt und sind im Gesamten Autoklavierbar. Ein bedruckbarer, doppelwandiger Kessel diente als Medienreservoir, in welchem zugleich die Temperatur mit einer Wasserbadheizung eingestellt werden konnte und der pH-Wert kontrolliert wurde (pH- und Temperaturelektrode Orbsint CPS11D-7BA21 von Endress+Hauser Messtechnik, Weil am Rhein). Der erhöhte Druck, sowie das stetige Rühren, ermöglichen eine bessere Löslichkeit des gasförmigen Substrats. Die Gasphase im System wurde alle 48 Stunden im Medienkessel ausgetauscht. Die Nährstoffversorgung des Biofilms erfolgte durch eine kontinuierliche Flussrate von 100 ml min<sup>-1</sup> mit Hilfe einer Magnetzahnradpumpe (ISMATEC REGLO-Z Digital, Cole-Parmer, Wertheim). Ein Graphitblock mit einer Oberfläche von 20 cm<sup>2</sup> (MR40, Müller und Rössner, Troisdorf-Bergheim) fungierte als Kathode, welche am Boden der Fließzelle eingelassen war. Als Gegenelektrode wurden sechs Iridium-Tantal beschichtete Titanplättchen (Platinode - MMO Anode 177, Umicore, Schwäbisch Gmünd) mit einer Oberfläche von insgesamt ebenfalls 20 cm<sup>2</sup> an der Seite der Fließzelle eingelassen. Der dazwischen befindliche, transparente Polycarbonatdeckel ermöglichte eine Analyse des Biofilms während der Kultivierung mittels optischer Kohärenztomographie.

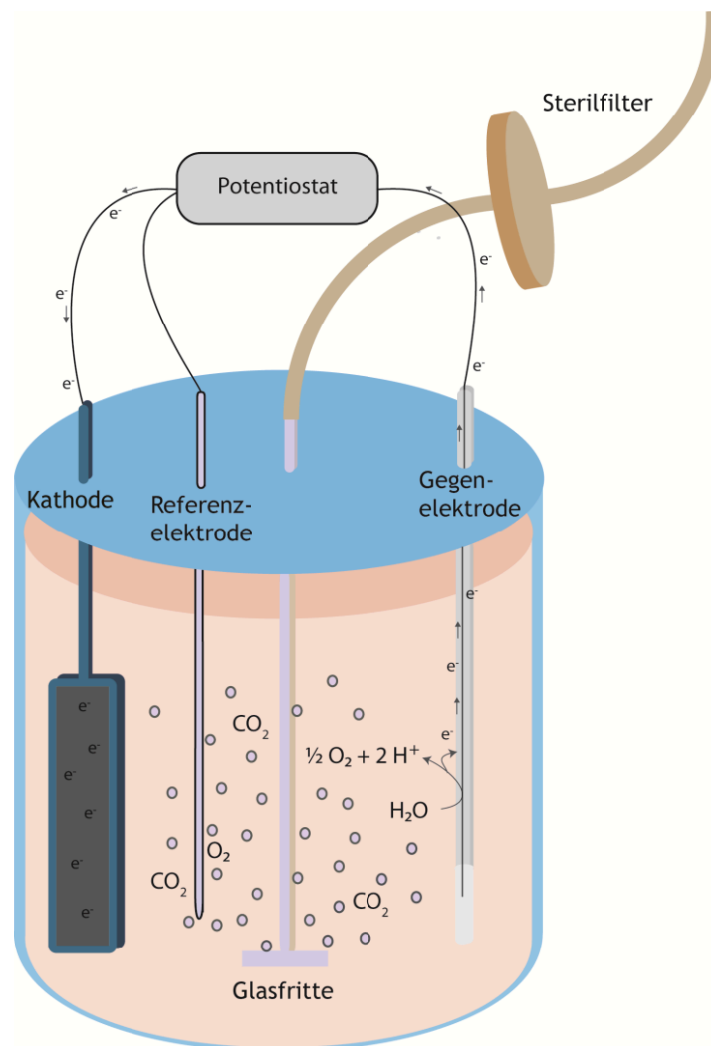


ABBILDUNG 2.1: Schematische Darstellung eines Aufbaus des Elektro-synthesereaktors, für die elektroautotrophe Kultivierung von *Sulfolobus acidocaldarius* (Unverändert aus Reiner, 2015)

## 2.2 Bildgebende Methoden

### 2.2.1 Fluoreszenzmikroskopie

Bei der Fluoreszenzmikroskopie wird eine Probe mit einem Fluorophor versetzt und mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt. Der Fluoreszenz-Farbstoff, der dieses Licht absorbiert wird dadurch in einen energiereichen, angeregten Zustand versetzt. Dieser ist jedoch instabil, die Energie wird daher schrittweise wieder abgegeben.

Einer dieser Zwischenschritte entspricht, im Falle von Nilrot, der Emission von rotem Licht (605 nm). Dieses wird durch einen Filter im Mikroskop und durch ein Okular geleitet oder auf dem Sensor einer Kamera detektiert. Das dadurch entstehende Abbild wurde mit einer Kamera vom Typ DFC360FX von Leica (Wetzlar) aufgezeichnet. Das eingesetzte Mikroskop

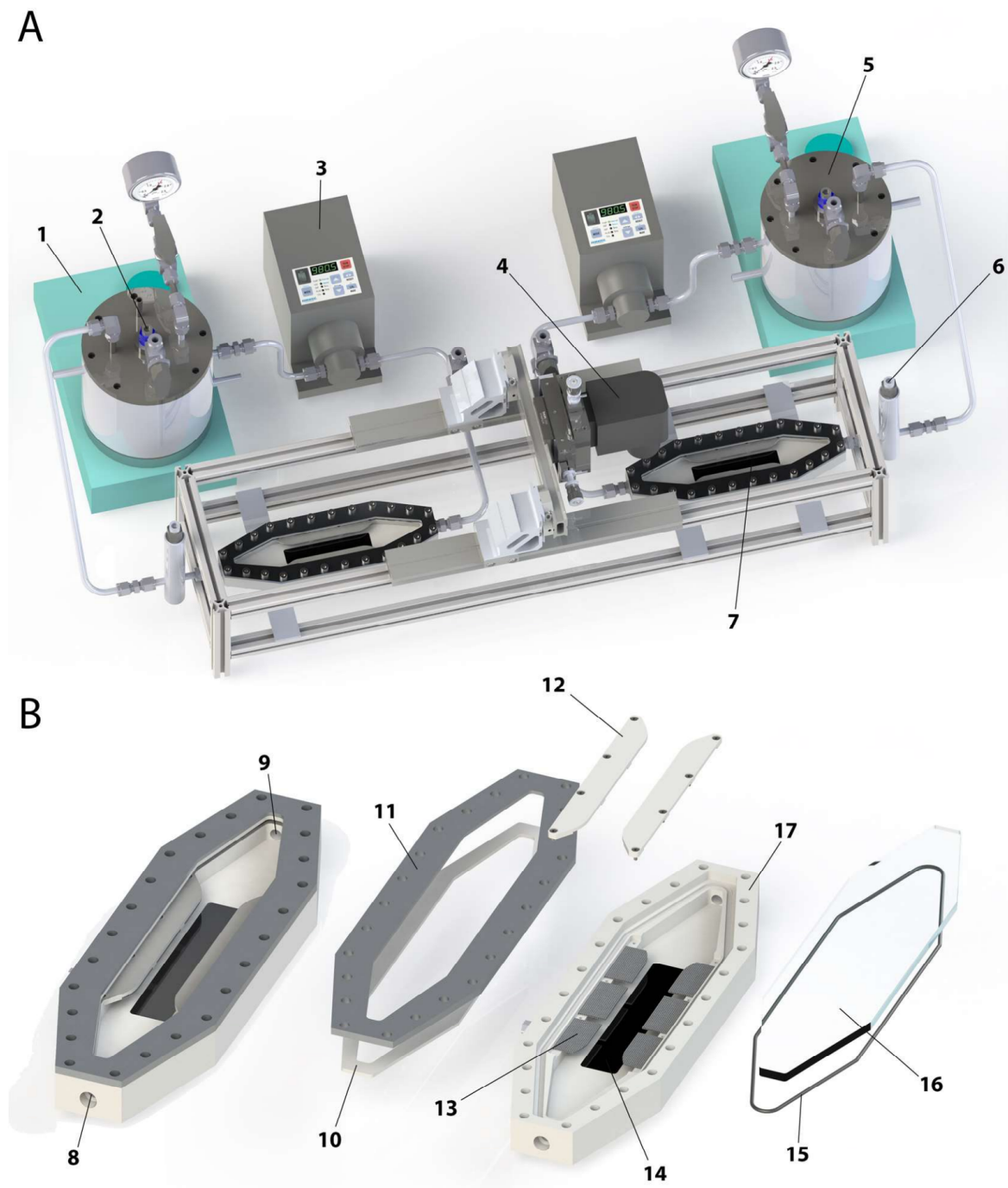


ABBILDUNG 2.2: Aufbau einer Fließzellenperipherie, aus Hackbarth *et al.*, 2020 (A) und Explosionszeichnung der Fließzellen (B). 1 – Magnetrührer; 2 – pH-Elektrode; 3 – Magnetzahnradpumpe; 4 – OCT-Sonde; 5 – Doppelwandiger Edelstahlkessel; 6 – Referenzelektrode; 7 – Fließzelle; 8 – Zufluss; 9 – Abfluss; 10 – Abstandshalter; 11 – Abdeckung; 12 – Anodenhalterung; 13 – Anodensegment; 14 – Kathode; 15 – O-Ring; 16 – Polycarbonat-Abdeckung; 17 – Gehäuse.

ist vom Typ DM5500B mit einem HCX PL Fluotar 100x/1.30 Öl Immersions-Objektiv von Leica (Wetzlar). Im Falle des in dieser Arbeit eingesetzten Phenoxazin Farbstoff Nilrot, erfolgte die Anregung mit einem Laser der Wellenlänge 545 nm (Spektrumsbreite 30 nm), das emittierte Licht wurde durch einen Filter der Wellenlänge 610 nm (Spektrumsbreite 75 nm) gemessen. Die Bilder wurden schließlich mit der Software LAS-AF von Leica erstellt und bearbeitet. Nilrot bindet spezifisch an hydrophobe Strukturen und zeigt dort eine charakteristische Fluoreszenz. Da Nilrot nicht mit dem Metabolismus der Zellen interferiert, auch in saurer Umgebung stabil ist, wurde es in dieser Arbeit mit einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zur Anfärbung der Zellmembran genutzt.

### 2.2.2 Optische Kohärenztomographie

Als nicht invasives bildgebendes Verfahren wird die optische Kohärenztomographie für dreidimensionale Scans von Strukturen, inklusive Biofilmen verwendet. Breitbandiges Licht mit kurzer Kohärenzlänge wird zugleich auf die Probenoberfläche und einen Spiegel geworfen. Die Reflektion und Streuung der Probe wird dabei mit der des Spiegels überlagert und das resultierende Interferenzmuster ausgewertet. Durch unterschiedlich starke Reflektionen und Streuung in der Tiefenebene der Probe kann somit eine Tiefeninformation in einem Punkt aufgezeichnet werden. Eine sequenzielle Analyse mehrerer Messpunkt entlang einer oder zweier Achsen ermöglicht somit eine zwei- bzw. dreidimensionale Rekonstruktion der Probe. Die Aufnahmen in dieser Arbeit entstanden mit einem Ganymede II - LSM04 OCT von Thorlabs (Dachau) und wurden an drei Stellen der Fließzelle gemacht, mit einem Messbereich von je 6 x 4 x 1 mm (L x B x T). Die Größe eines Voxel (Dreidimensionaler Bildpunkt) definiert sich dabei auf 4 x 4 x 2,15 (T) µm. Die Prozessierung der Daten folgte der Methodik von Hackbarth *et al.*, 2020.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Klonierungsarbeiten

#### Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion wurde eingesetzt um bestimmte Elemente aus genomischer DNA, Plasmiden und präparierten Fragmenten zu amplifizieren. Es kamen je nach Einsatzzweck zwei verschiedene Polymerasen zum Einsatz. Die Taq-Polymerase im 2x MangoMix™ der Firma Bionline (Luckenwalde), besitzt eine Fehlerrate von etwa  $10^{-4}$ /bp und wurde daher nur für analytische Zwecke eingesetzt. Eine solche Reaktion wurde in der Regel im 15 µl-Ansatz mit einer Zusammensetzung nach Tabelle 2.9 angesetzt.

TABELLE 2.9: Zusammensetzung einer typischen Mango-PCR.

Komponente	Menge für einen Ansatz
2x MangoMix (inkl. Polymerase)	7,5 µl
Primer for und rev (10 µM)	Je 1 µl
DNA-Template	ca. 10 ng
H <sub>2</sub> O	add. 15 µl

Für die Amplifizierung von Fragmenten, welche im Anschluss für weitere Klonierungsarbeiten präpariert werden sollten, kam die PCR BIO HiFi DNA Polymerase® von PCR Biosystems (London, Großbritannien) mit einer 3' → 5' Exonuklease *Proofreading* Aktivität, zum Einsatz. Durch die *Proofreading* Aktivität sinkt die Fehlerrate dieser Polymerase auf einen Wert von ca.  $2,2 \times 10^{-8}$ /bp. Ein entsprechender Ansatz für eine Reaktion im 50 µl Maßstab ist in Tabelle 2.10 gezeigt.

TABELLE 2.10: Zusammensetzung einer typischen PCR BIO HiFi-PCR.

Komponente	Menge für einen Ansatz
5x Puffer (inkl. dNTPs)	10 µl
Primer for und rev (10 µM)	Je 2,5 µl
DMSO	1,5 µl
DNA-Template	ca. 10 ng
PCR BIO HiFi-Polymerase	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	add. 50 µl

Die Reaktionen erfolgten in einem Thermocycler vom Typ S1000 von BioRad (München). Das Programm für die Reaktion ist in Tabelle 2.11 dargestellt.

TABELLE 2.11: PCR-Programm für die Amplifikation von DNA-Fragmenten.

Funktion	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	300 s
Denaturierung	95 °C	15 s
Primer Annealing	50-70 °C	15 s
Elongation	72 °C	je kbp 30 s
Finale Elongation	72 °C	300 s
Konservierung	12 °C	∞

Sämtliche in diese Arbeit für Klonierungen und Sanger-Sequenzierungen verwendeten Primer sind in Tabelle 2.12 aufgeführt.

### Restriktionsverdau und Ligation

Für den Restriktionsverdau und die Ligation von DNA wurden entsprechende Nukleasen und die T4-Ligase der Firma New England Biolabs (Schwalbach) nach Herstellerangaben eingesetzt. Es kamen ausschließlich *high-fidelity* Nukleasen in Cutsmart-Buffer zum Einsatz.

### Agarose-Gelelektrophorese und Aufreinigung

Zur Aufreinigung und Auftrennung ihrer Größe nach, wurden DNA-Fragmente aus PCR- und Restriktionsverdau-Ansätzen einer Gelelektrophorese unterzogen. Das Gel bestand aus 1 % Agarose (w/v) in TAE-Puffer (Tabelle 2.13). Nach Aufkochen des Puffers mit Agarose wurden 0,6 µg/ml FastGene® Midori Green Direct der Firma Nippon Genetic (Dueren) hinzugegeben und der gesamte Ansatz in eine Form gefüllt, in welche Platzhalter für Taschen eingesetzt wurden. Nach Abkühlen und Auspolymerisieren des Gels, wurde dieses in einer TAE-Puffer (Tabelle 2.13) befüllten Kammer platziert. Die Proben wurden mit 6x DNA-Probenpuffer von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) versetzt und in die vorgeformten Taschen pipettiert. PCR-Reaktionen welche mit dem MangoMix™ durchgeführt wurden, enthalten den Ladepuffer bereits im Ansatz. In einer Tasche des Gels wurde bei jedem Lauf als DNA-Größenstandard der GeneRuler 1 kb DNA ladder von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) eingesetzt. Durch Anlegen einer Spannung von 120 V mit Hilfe eines Powerpac HC der Firma BioRad (München) wurden die Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt. Zur Aufreinigung einzelner Fragmente aus einem präparativen PCR-Ansatz wurden die Fragmente im Gel auf einem FastGene® Blue/Green Transilluminator von Nippon Genetics (Dueren) detektiert und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Diese Gelstücke wurden anschließend mit dem Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System von Promega (Mannheim) nach Herstellerangaben aufgereinigt.



TABELLE 2.12: In dieser Arbeit verwendete Primer mit Sequenz.

Name	Sequenz
pT7 Test for	CGGCTCGTATGTTGTGTGG
pT7 Test rev	GGATGTGCTGCAAGGCGAT
CymA for	TAGGCAAGTCGCGGCCGCTTCCC GTGTTAGATGAACTGGC GTGCACTATT
CymA rev	CCGCCAAAACAGCCAAGCTGGAGACCGTTTAAACTTATCC TTTTGGATAGGGGT
CymA ES for	TAGGCAAGTCGCGGCCG
CymA ES rev	CCGCCAAAACAGCCAAGCTGGAGACCGTTTAAACTCACTC CTCATCCGGATGC
NapC for	TAGGCAAGTCGCGGCCGCTTCCC GTGTTAGATGGGAAATT CTGACCGTA
NapC rev	CCGCCAAAACAGCCAAGCTGGAGACCGTTTAAACTTAAAA ACCTGGCTCGACTT
MtrABs for	GTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATACCCATGGATGGG CAAGTTCCAGGTGAA
MtrABs rev	GCGTCACTCTCCTGCGTTTT CAGCTAGCTAATCAGAGCTTG TACGACATG
pioAB for	GTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATACCCATGGATGGG CGGCTCGCGGGGCG
pioAB rev	GCGTCACTCTCCTGCGTTTT CAGCTAGCTAATCACCCTTG GCGTTGAGC
MtoAB1 for	GTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATACC
MtoAB2 rev	GCGTCACTCTCCTGCGTT
STC for	TTAGCTAGCTGAAACGCAGGAGAGTGACGCATGAGCAAAA AACTATTAAG
STC rev	CTAACACGGGAAGCGGCCGCGACTTGCCTATTACTTCTTC AGAACAGAC
MtoD for	TTAGCTAGCTGAAACGCAGGAGAGTGACGCATGACCCGTC AAGCTTATTC
MtoD rev	CTAACACGGGAAGCGGCCGCGACTTGCCTACTAGAGCGAA AGGATCCAG
pioC for	TTAGCTAGCTGAAACGCAGGAGAGTGACGCATGAACGACA AGCGCAACGA
pioC rev	CTAACACGGGAAGCGGCCGCGACTTGCCTATCACGCCTTG CCGGCGTAGA
pBBR rep rev	CCTCCCAGAGCCTGATAAA
ParaC pBBR	GATTCACCGTTTTTATCAGGCTCTGGGAGGATGCATAATG TGCCTGTCAAATGG
Pararev pBAD	CCGCCAAAACAGCCAAGCTGGAGACCGTTTAAACGGTAT GTATATCTCCTTCTTAA
Urarev pBAD	GTTTAAACGGTCTCCAGCTTGGCTGTTTTTGGCGG <sub>a</sub> TTGTG AGTTTAGTATACATGC
Hefe for	AGAATGCTTAATGAATTACAACAGTTTTTATAACAAGCCA TGAAAACCG
Hefe rev	CGGGGAGAGGCGGTTTTGCGTATTGGGCGCATTGTGAGTTT AGTATACATGC

TABELLE 2.13: Zusammensetzung des TAE-Puffers.

Substanz	Einwaage für 1 L	Konzentration
Tris	4,85 g	40 mM
EDTA	0,37 g	1 mM
Essigsäure zum Einstellen des pH-Wertes		

### Fragmentsicherung in pT7blue

Zur Sicherung synthetisierter Fragmente wurden diese mit Hilfe des pT7Blue Perfectly Blunt Cloning Kit von Merck (Darmstadt) nach Herstellerangaben in das Sicherungsplasmid pT7Blue blunt kloniert.

### 2.3.2 Markerlose Ligation in *S. cerevisiae*

Die markerlose Ligation mehrerer DNA-Fragmente erfolgte durch eine Transformation in *S. cerevisiae*. Hierbei macht man sich ihre Fähigkeit zur homologen Rekombination zu Nutze. Dafür wurden die entsprechenden Fragmente durch eine PCR mit Primern amplifiziert, welche zueinander homologe Überlappungsbereiche besitzen.

Die Transformation erfolgte dabei nach dem Protokoll von Gietz und Schiestl (2007). Zur Vorbereitung kompetenter Zellen wurden  $5 \times 10^6$  Zellen/ml einer Übernachtskultur in frisches Medium überführt und weitere vier Stunden bei 30° C schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden mit durch Zentrifugation bei 3000 g geerntet und in sterilem ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurden sie einer Lösung mit 5 % (v/v) Glycerin und 10 % (v/v) DMSO resuspendiert und zur Lagerung langsam bei -80° C eingefroren.

Zur Transformation wurden die kompetenten Hefezellen für 30 Sekunden bei 37 °C aufgetaut, bei 13000 g abzentrifugiert und das Pellet sofort im Transformationsmix (Tabelle 2.12) aufgenommen. Nach einer Inkubation für 60 Minuten im Wasserbad bei 42 °C wurden die Zellen wieder bei 13000 g abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml sterilem ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Verschiedene Verdünnungen wurden auf Agar-Platten mit synthetischem Dropout Medium (Tab. 2.15) ausplattiert und einige Tage bei 30° C inkubiert.

Aufgrund der Uracil Auxotrophie können nur Hefezellen auf diesen Platten wachsen, welche ein Plasmid mit dem *ura3*-Gen tragen. Da eine Ligation des Plasmids nur über homologe Sequenzen erfolgt, ergibt sich hierbei eine sehr spezifische Ligation. Für den Transformationsmix wurden sämtliche Fragmente in äquimolaren Mengen eingesetzt. Als Negativkontrolle wurden einzelne Fragmente transformiert.

TABELLE 2.14: Zusammensetzung des Puffers für die Transformation von *S. cerevisiae*.

Substanz	Volumen	Konzentration
PEG 3350 (50 % (w/v))	260 µl	36 % (w/v)
Lithiumacetat 1 M	36 µl	100 µM
Einzelsträngige Träger DNA (2mg/ml)	50 µl	280 µg/ml
Plasmid + DNA Fragmente	14 µl	
Endvolumen	360 µl	

TABELLE 2.15: Zusammensetzung des synthetischen Dropout (SD) Mediums.

Substanz	Einwaage für 1 L	Hersteller
Hefe-Stickstoff-Basismedium	4,85 g	Biomol, Hamburg
Uracil Drop-out Supplemente	0,77 g	Biomol, Hamburg
Glukose	20 g	

Die Glukose wurde nach dem Autoklavieren sterilfiltriert hinzugegeben

### 2.3.3 Stamm-Transformation

#### Transformation von *E. coli*

Zur Präparation elektrokompenter *E. coli*-Zellen wurde zunächst in SOB-Medium (Tabelle 2.3) bis zur exponentiellen Phase kultiviert. Anschließend wurden die Zellen auf 4 °C gekühlt und pelletiert. Nach viermaligem Waschen wurden die Zellen in einer geringen Menge deionisiertem Wasser resuspendiert.

100 µl der Zellsuspension wurden mit 100 ng zirkulärer Plasmid-DNA in einer Elektroporationsküvette für 4–6 ms einer Spannung von 1,8 kV durch einen MicroPulser™ von BioRad (München) ausgesetzt. Sofort nach der Elektroporation wurden die Zellen in 450 µl vorgewärmtem SOC-Medium (Tabelle 2.3) aufgenommen und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen auf LB-Agar mit entsprechenden Selektionsmarkern ausplattiert.

#### Konjugation

Für den Transfer von Plasmiden in Bakterienstämme, welche nur mit geringer Effizienz per Elektroporation transformiert werden können, wurde die Konjugation eingesetzt. Das zu transferierende Plasmid wurde zunächst in einen, für die Elektroporation leicht zugänglichen, *E. coli* WM3064 transformiert. Dieser Stamm ist zur Konjugation befähigt und besitzt eine Auxotrophie für die 2,6-Diaminopimelinsäure (DAP). Donorstamm und Akzeptorstamm wurden bis zur exponentiellen Phase in LB Medium kultiviert, geerntet und in LB Medium

gewaschen. Zellsuspensionen beider Stämme wurden in gleichen Teilen gemischt und auf eine LB Platte ohne Antibiotika aber mit DAP getropft, aber nicht ausgestrichen. Diese Platte wurde für 6 Stunden bei 30° C inkubiert und anschließend mit LB Medium wieder von der Platte geschwemmt. Die Zellsuspension wurde drei Mal in LB Medium gewaschen, um restliches DAP zu entfernen. Schließlich wurde die Zellsuspension auf LB Platten mit Antibiotika aber ohne DAP in mehreren Verdünnungen ausplattiert. Diese Platten wurden für 30 Stunden bei 30 °C inkubiert. Aufgrund der DAP-Auxotrophie des *E. coli* Stamms, wird hierbei auf den Akzeptorstamm mit aufgenommenen Plasmid selektiert. Zugleich wird durch die Anwesenheit von Antibiotika auf Zellen selektiert, welche das Plasmid aufgenommen haben.

### **Gendeletion**

Die markerlose Gendeletion erfolgte durch Konjugation eines Plasmids welches einen R6K Replikationsursprung besitzt, welcher im Empfängerstamm nicht für eine Replikation genutzt werden kann, und dafür ins Genom integriert werden muss. Hierfür wurden wiederum DNA-Sequenzen in das Plasmid integriert, welche eine Integration über homologe Rekombination ermöglichen. Diese Sequenzen entsprechen den Bereichen vor und nach dem zu deletierenden Gen. Für die Integration des Plasmids wurde auf eine Kanamycin Resistenz selektiert. In einem zweiten Selektionsschritt wurden positive Kolonien in LB-Medium angezogen und auf Sucrose Platten ausplattiert. Das ebenfalls im Plasmid integrierte Gen *sacB* kodiert für die Levansucrase, welche eine Polymersierung von Sucrose zu Levan katalysiert. Die Polymerisation erfolgt in Gram-negativen Bakterien im Periplasma, was eine letale Störung des Stoffaustauschs zur Folge hat. Im zweiten Schritt wird daher auf eine Exzision des Plasmids aus dem Genom selektiert. Durch homologe Rekombination sind dabei zwei Varianten möglich, in denen das Plasmid ohne das Zielgen entfernt wird (Revertante) oder mit diesem Gen (Mutante). Die statistische Gleichverteilung dieser beiden Varianten lässt schließlich eine Identifikation der Mutanten über PCR und Sangersequenzierung zu.

## **2.4 Nukleinsäure-Aufreinigung und Analyse**

### **2.4.1 Isolierung von Plasmiden**

Eine Plasmidisolierung erfolgte in der Regel mit Hilfe des Wizard® SV Miniprep DNA Purification System von Promega (Mannheim) aus einer 5 ml Übernachtskultur. Das Produkt wurde anschließend in 30 µl nuklease-freiem Wasser eluiert.

Für die Aufreinigung großer Plasmide, mit einer hohen Reinheit ohne Fragmentierung der DNA, erfolgte die Aufreinigung mit Hilfe des FosmidMax™ DNA Purification Kit von Lucigen (Middleton, USA) nach Herstellerangaben.

Für die Isolation von Plasmiden aus *S. cerevisiae*, wurde eine Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und in einem Lytikase-Zellysis Puffer für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Isolation mit dem FosmidMax™ DNA Purification Kit Protokoll fortgesetzt.

TABELLE 2.16: Zusammensetzung des Zellyse Puffers.

Substanz	Einwaage für 1 mL	Konzentration
Tris	4,84 mg	40 mM
EDTA	292 µg	1 mM
Lytikase	1 mg	200 units / ml
DTT	3,08 mg	20 mM

## 2.4.2 Isolierung genomischer DNA

Die Isolierung der genomischen DNA aus Umweltsanierungsproben gelang mit Hilfe des Qiagen DNeasy PowerBiofilm Kit Protokolls (Qiagen, Hilden). Dafür wurde ein Stück eines Graphit-Vlies ausgeschnitten und direkt in ein bereitgestelltes 2 ml-Gefäß mit Glasperlen gegeben und mit vorgewärmtem Puffer für 20 min auf einem Vortex homogenisiert. Im weiteren Protokoll wurde soweit möglich, auf weitere Vortex und Pipettier-Schritte verzichtet und durch Invertieren ersetzt, um eine Scherung hochmolekularer DNA zu vermeiden. Die DNA wurde schließlich in 50 µl Nuklease-freien Wasser über Nacht bei Raumtemperatur eluiert und bei -20 °C gelagert.

## 2.4.3 RNA-Isolierung

Die Isolierung von RNA aus Umweltsanierungsproben gelang zunächst analog zur DNA-Isolierung mit dem Qiagen RNeasy PowerBiofilm Kit Protokoll (Qiagen, Hilden). Da für eine Illumina Sequenzierung kurze Fragmentlängen ausreichen, wurden keine Modifikationen des Protokolls vorgenommen. Die Elution erfolgte am Ende in Nuklease-freiem Wasser, ehe sofort ein weiterer DNase-Verdau mit Hilfe des RNase-Free DNase Set (Qiagen, Hilden) durchgeführt wurde. Eine anschließende rRNA-Depletion gelang mit Hilfe des NEBNext® rRNA Depletion Kit (Bacteria) Protokoll von NEB. Zwischenzeitliche Aufreinigungen der RNA erfolgten durch eine Bindung an Agencourt RNAClean XP beads (Beckman-Coulter) und zweimaligem Waschen mit 75 % Ethanol, in welchem vorher durch eine 30 minütige UV-Bestrahlung Nukleasen deaktiviert wurden.

Für die Isolierung von RNA aus *Sulfolobus acidocaldarius* wurde das Graphit-Vlies bzw. ein Zellpellet direkt in TRIzol™ Reagenz (ThermoFisher Scientific) gegeben. Dem Hersteller Protokoll folgend wurde die RNA isoliert. Da durch diese Aufreinigungsmethode Phenol-Rückstände bleiben, wurde die Probe im Anschluss zweimal mit eiskaltem Diethylether

vermischt und nach 10 minütiger Inkubation bei 4 °C die organische Phase abgenommen. Schließlich erfolgte ein DNase-Verdau wie oben beschrieben. Da eine rRNA-Depletion für *Sulfolobus* ineffektiv ist, wurde in diesem Fall darauf verzichtet. Eine Lagerung der RNA erfolgte, falls nötig, bei -20 °C)

#### 2.4.4 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration und -Reinheit

Die DNA- und RNA-Konzentrationen sowie deren Reinheit wurden mit Hilfe eines NanoDrop Spektrophotometers des Typs ND-1000 von Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts) bestimmt.

Für Sequenzierungen erfolgte zusätzlich eine präzisere Bestimmung der doppelsträngig vorliegenden DNA mit Hilfe eines Qubit™ dsDNA HS Assay Kit Protokoll von ThermoFisher Scientific (Waltham, Massachusetts) Für eine Bestimmung der RNA-Konzentration kam das Qubit™ RNA BR Assay Kit Protokoll vom selben Hersteller zum Einsatz. Die Auswertung der Ansätze erfolgte in einem Infinite M200 PRO Multimode Microplate Reader von Tecan. Für DNA erfolgte eine Fluoreszenz-Messung bei 480/530 nm und für RNA bei 630/660 nm.

Um die Probenkonzentration für Sequenzierungen zu bestimmen wurde zusätzlich die Fragmentlängenverteilung auf einem 2100 Bioanalyzer von Agilent (Santa Clara, USA) mit einem High Sensitivity DNA Assay bestimmt.

## 2.5 Sequenzierungen

### 2.5.1 Sanger-Sequenzierung

Zur Kontrolle klonierter DNA-Abschnitte wurden amplifizierte Gen-Abschnitte aufgereinigt bzw. Plasmide präpariert und mit Hilfe des Mix2Seq Kit Protokoll von MWG Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg) sequenziert. Diese erfolgte auf Grundlage der von Frederick Sanger entwickelten Kettenabbruch-Methode (Sanger *et al.*, 1977).

### 2.5.2 Brückensynthese-Sequenzierung (Illumina)

Für die Sequenzierung von Transkriptomen wurde die Brückensynthese-Sequenzierung Technologie von Illumina genutzt. Bei der Amplifikation von kurzen DNA-Strängen bilden sich an einer Fließzellenoberfläche Cluster identischer DNA-Kopien, deren Sequenz im Anschluss über einen Kettenabbruch ähnlich wie bei der Sanger-Sequenzierung mit Fluorophoren bestimmt wird. Die simultane Sequenzierung vieler Fragmente gleichzeitig ermöglicht somit eine Kosten- und zeiteffiziente Sequenzierung mit geringer Fehlerrate (Bentley *et al.*, 2008). Für die Probenvorbereitung wurde das NEBNext Ultra II Directional RNA Library Kit

Protokoll verwendet. Zur parallelen Sequenzierung mehrerer Proben wurde das NEBNext Multiplex Oligos - Index Primer Set 2 genutzt. Die Sequenzierung erfolgte in einfacher Sequenzierichtung mit 75 Zyklen (wodurch sich eine *readlänge* von 75 bp ergibt) auf einem NextSeq550 System.

Für die Metatranskriptome wurde eine Anzahl von 100 Millionen Sequenzen anvisiert, für vergleichende Transkriptome 15 Millionen Sequenzen.

### 2.5.3 Nanopore-Sequenzierung

Die Nanopore-Sequenzierung von Oxford Nanopore Technologies ( - ONT, Oxford, UK) gehört zu den *next-generation* Sequenziermethoden der 3. Generation. Die Sequenzierung einzelner DNA-Fragmente erfolgt während des Transports von DNA-Einzelsträngen durch Poren einer Membran. Eine Leitfähigkeitsmessung entlang der Pore lässt einen Rückschluss auf die Nukleotid-Sequenz zu. Eine Sequenzierung einzelner, sehr langer DNA-Fragmente (bis zu 2 Megabasen) ist somit möglich. Im Gegensatz zu anderen Methoden findet hierbei keine Amplifikation der DNA statt, wodurch ein Fehler der Polymerase Nukleotidspezifität vermieden wird. Allerdings ist die derzeitige Entwicklungsstufe dieser Technologie noch mit einer vergleichsweise hohen Fehlerrate von mindestens 5-15 % verbunden, welche entweder eine Konsensuskorrektur eines assemblierten Genoms erfordert oder einen Abgleich mit einer präzisen Datenbank (Karst *et al.*, 2021). Der Vorteil der langen Einzelsequenzen wurde daher für die Assemblierung von Metagenomen, sowie für die Identifikation von zufallsklonierten Plasmiden genutzt. Die Proben wurden mit Hilfe des Ligation Sequencing Kit Protokoll SQK-LSK109 (ONT) vorbereitet und mit Hilfe des Native Barcoding Expansion EXP-NBD104 Pakets (ONT) mit Marker versehen. Die Sequenzierung von Plasmiden erfolgte auf Flongle Fließzellen (FLO-FLG001) und für Metagenome auf MinION Fließzellen (FLO-MIN106D). Diese Fließzellen sind mit Poren der Generation R9.4.1 ausgestattet. Für das Basecalling wurde Guppy in Versionsnummer 4.0.4 (ONT) mit dem high accuracy Modell verwendet. Das Demultiplexing erfolgte mit qcat (v1.1.0, ONT) Da das Kit zur DNA-Bibliothek-Präparation spezifisch für lineare Fragmente ist, wurden Plasmide zur Sequenzierung vorher mit einem Restriktionsenzym geschnitten. In der Regel geschah dies mit XbaI (NEB), da dieses Enzym in sämtlichen Konstrukten nur einmal bindet.

Für die Sequenzierung der Metagenome wurde eine Gesamtsequenziertiefe von je 5 Gbp anvisiert mit einer durchschnittlichen Fragmentlänge über 5 kbp. Für die Sequenzierung von Plasmiden wurden je 500 - 5000 Sequenzen anvisiert, welche je ein gesamtes Plasmid abdecken (ca. 12 - 14 kbp).

## 2.6 Bioinformatische Methoden

### 2.6.1 Generelle Sequenzanalysen und allgemeine *in silico*-Arbeiten

Für Plasmid- und Primer Design, sowie *in-silico*-Analysen von Sekundärstrukturen, DNA- und Proteinsequenzabgleiche, Plasmidannotation, *Codon-usage*, kam die Software CLC Main Workbench in der Version 20.0 von Qiagen (Aarhus, Dänemark) zum Einsatz. Für Sequenzabgleiche kam dabei in der Regel der BLAST-Algorithmus zum Einsatz. Eine Codon-optimierung für eine Gensynthese (welche bei ThermoFisher Scientific beauftragt wurde) erfolgte aufgrund der statistischen codon-usage Auswertung und Sekundärstrukturanalysen aus CLC in MS Excel. Die Auswertung von Plasmid-Sequenzierungen auf der MinION-Plattform erfolgte durch einen reversen BLAST in der CLC Main Workbench. Die Referenzplasmidkarten wurden dafür als *query* gegen eine Datenbank aus *reads* abgeglichen. Die Ergebnisse wurden zunächst nach Größe und *alignment*-Qualität gefiltert, ehe eine statistische Auswertung in Excel erfolgte.

### 2.6.2 Metagenom- und Metatranskriptomanalysen

Eine Auflistung aller Programme und Datenbanken, welche für die Auswertung genutzt wurden sind mit der genutzten Versionsnummer in Tabelle 2.17 aufgelistet. Falls nicht anders beschrieben wurden die Analysen mit Standardparametern durchgeführt.

Vor einer Analyse der Nanopore-*reads*, wurden diese mit FiltrLong nach Größe (mindestens 1000 bp), Qualität (besten 90 %) und Sequenzidentität gefiltert. Illumina-*reads* wurden mit Trimmomatic nach Qualität getrimmt und gefiltert.

Die Assemblierung eines Metagenoms erfolgte durch *metaFlye* in drei Iterationen. Dafür wurden neben einer Assemblierung einzelner Proben, die Sequenzierdaten aller Proben für die Assemblierung einer präziseren Referenz genutzt. Eine Sequenzkorrektur der Assemblierung erfolgte mit *Medaka* für eine Reduktion von Homopolymer-verursachten Sequenzierfehlern. Mit Hilfe von *Racon* wurde anschließend eine Konsensus-Korrektur von Sequenzierfehlern durchgeführt. Das Mapping der Illumina Transkriptomdaten sowie der Nanopore Genomdaten erfolgte für eine Sequenzkorrektur mit *Minimap2* und *Bowtie2*. Für die Sequenzkorrektur mit Hilfe der Illumina-*reads* wurden die Parameter *-u*, *-F* und *-no-trimming* genutzt, durch welche auch nicht-transkribierende Sequenzbereiche erhalten bleiben, welche nicht durch die Transkriptom-*reads* korrigiert werden konnten. Eine Identifikation kodierender DNA-Bereiche erfolgte durch *Prodigal* mit der Option *-p meta* für taxonomisch diverse Proben. Für kodierende Sequenzen wurde die Aminosäuresequenz eines jeden Gens mittels DIAMOND gegen die Uniprot Knowledgebase Datenbank abgeglichen.



TABELLE 2.17: Programme für die bioinformatische Auswertung der vergleichenden Metagenome und -transkriptome mit der genutzten Versionsnummer und Referenz.

Programm	Version	Referenz
Filtlong	0.2.0	github.com/rrwick/Filtlong
metaFlye	2.8.2	Kolmogorov <i>et al.</i> , 2020
Medaka	1.2.1	github.com/nanoporetech/medaka
Racon	1.4.16	github.com/isovic/racon
Minimap2	2.17	Li, 2018
Bowtie2	2.4.2	Langmead <i>et al.</i> , 2012
Prodigal	2.6.3	Hyatt <i>et al.</i> , 2010
DIAMOND	2.0.2.140	Buchfink <i>et al.</i> , 2015
MetaBAT	2.2.15	Kang <i>et al.</i> , 2019
GenomeQC	–	Manchanda <i>et al.</i> , 2020
Kallisto	0.46.1	Bray <i>et al.</i> , 2016
KEGG Mapper	4.3	Kanehisa <i>et al.</i> , 2020
MetaboMAPS	1.1.0	Koblitz <i>et al.</i> , 2020
UniProt IDmapping	3.0	uniprot.org/uploadlists/
Datenbank	Version	Quelle
UniProt KB	2020_02	uniprot.org/
KEGG	97.0	genome.jp/kegg/

Die anschließende funktionelle und phylogenetische Annotation des wahrscheinlichsten Treffers basierend auf dem UniProt-Identifikator erfolgte durch ein selbstgeschriebenes Skript (siehe Anhang). Eine taxonomische Einteilung basierend auf der Tetranukleotidfrequenz der Sequenzen erfolgte mit *MetaBAT* und wurde bei Bedarf anschließend händisch basierend auf der Sequenzierabdeckung im Vergleich der einzelnen Proben überprüft und korrigiert. Zusätzlich wurden nicht-assemblierte, Nanoporesequenzierdaten für einen taxonomischen Vergleich zur Abdeckung des Metagenoms direkt durch einen DIAMOND BlastX annotiert. Die Vollständigkeit eines Genoms basierend auf zugeordneten *contigs* wurde mittels GenomeQC ermittelt.

Um die taxonomische Diversität der einzelnen Genom- und Transkriptomdaten zu analysieren, erfolgte ein *mapping* durch *Minimap2* und *Bowtie2* der einzelnen Proben gegen das Metagenom. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe eines selbstgeschriebenen Skripts (siehe Anhang) nach taxonomischen Gruppen erfasst, sortiert und zusammengefasst, ehe eine statistische Auswertung in *MS Excel* stattfand. Das *mapping* zum Metagenom und die Auswertung der Transkriptome für die Berechnung von TPM-Werten erfolgte mit *Kallisto*. Abweichend von den Standardparametern, wurde mit *–single-overhang* das teilweise *alignment* von reads außerhalb kodierender Regionen erlaubt. TPM-Werte (*transcripts per million*) sind normalisierte Expressionswerte, welche den Vergleich zwischen einzelnen Proben

ermöglichen. Diese wurden in Excel statistisch ausgewertet und für einen Abgleich für die KEGG-Datenbank vorbereitet. Hierzu wurde zusätzlich das UniProt IDmapping Tool verwendet um das KEGG-Analog des UniProt-Identifikator zu bestimmen. Einzelne Analysen langer DNA-Fragmente wurden in der CLC Genomics Workbench in der Version 20.0 von Qiagen (Aarhus, Dänemark) durchgeführt.

### **Vergleichende Transkriptom-Analysen**

Die Analyse der vergleichenden Transkriptome aus *S. acidocaldarius* wurde durch den RNAseq-Workflow in der CLC Genomics Workbench in der Version 20.0 von Qiagen (Aarhus, Dänemark) durchgeführt. Als Einstellungen für die Analyse wurden *mismatch*, *insertion und deletion cost* auf drei gesetzt, *textlength similarity fraction* auf 0.8. ein *mapping* der *reads* erfolgte gegen das *S. acidocaldarius* Genom (CP020364.1) strangspezifisch revers auf alle Gensequenzen. Die Ergebnisse wurden als TPM-Werte ausgewertet.

Für die statistische Auswertung wurde Excel genutzt. Die Repräsentation der relativen Expressionswertänderungen in metabolischen Stoffwechselwegen wurde mit MetaboMAPS dargestellt.

## Kapitel 3

# Ergebnisse

In dieser Arbeit sollten Mechanismen für einen direkten Elektronenimport von unlöslichen, extrazellulären Elektronendonoren identifiziert und charakterisiert werden.

Da ein direkter Elektronentransportweg in umgekehrter Richtung aus dem Zellinneren nach außen vergleichsweise gut beschrieben ist, bestand ein Teil dieser Arbeit darin, eine Methode zu entwickeln, durch welche Schlüsselemente dieser Mechanismen identifiziert und als Minimalset für eine heterologe Expression in nicht exoelektrogenen Organismen angepasst werden können. Ein erstes übergeordnetes Teilprojekt dieser Arbeit bestand daher in der Entwicklung synthetischer, extrazellulärer Elektronentransportketten. Die Ergebnisse zu diesen Versuchen werden im folgenden, ersten Teilabschnitt des Kapitels präsentiert.

Der zweite Abschnitt dieses Kapitels trägt Ergebnisse zusammen, welche der Suche nach natürlichen Elektronenaufnahmemechanismen gewidmet sind. Einige Bakterien und Archaeen wurden bereits auf Kathoden beschrieben. Für die wenigen Fälle in denen ein Elektronentransport beschrieben ist, scheint dieser jedoch von einer Wasserstoff-Produktion abhängig zu sein. Um die Interaktion mit einer Kathode besser zu verstehen ist dieser Mechanismus jedoch ungeeignet, da eine kathodische Wasserstoffproduktion auch abiotisch erfolgen kann.

Für diese Arbeit lag der Fokus daher auf wasserstoffunabhängigen, direkten Elektronenaufnahmemechanismen. Im Erdreich wurden bereits einige exoelektrogene Bakterien entdeckt. Eine kathodische Umwultanreicherung im Erdboden dient daher als Vorlage um neue Schlüsselgene für einen Elektronentransport zu entdecken. Aufgrund der im Lauf dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse wurde schließlich ein potenzieller Kandidat für eine biotechnologische Anwendung an einer Kathode charakterisiert. Die Ergebnisse hierzu finden sich am Ende des Kapitels.

## 3.1 Entwicklung synthetischer EET-Ketten

Wie in Abschnitt 1.3.2 beschrieben entstehen bei einer heterologen Expression einer bekannten extrazellulären Elektronentransportkette Schwierigkeiten, welche von vielen Faktoren wie der c-Typ Cytochrom Maturation und dem korrekten Einbau der Proteine in die äußere Membran abhängen. Für die heterologe Expression gestaltet sich der Nachbau dieser Faktoren zum Teil schwierig. Der homologe, modulare Aufbau der Elektronentransportketten in vielen Spezies, lässt jedoch Schlüsselemente vermuten, welche organismenspezifische Anpassungen besitzen. Statt nach zusätzlichen Faktoren, ist daher auch die Suche nach einem passenden Modul in der heterologen Expression denkbar. Hierfür wurde in dieser Arbeit eine Methode entwickelt, welche ein gezieltes *screening* nach einer Elektronentransportkette ermöglicht, welche aus Modulen von bekannten exoelektrogenen Organismen neu zusammengesetzt ist. Für die Etablierung der Methode wurde die EET-Kette aus *S. oneidensis* in drei Module untergliedert. Nachdem homologe Gene für diese Module ausgewählt waren, sollen sämtliche Kombinationen der Module simultan in einem Ziel-Organismus eingebracht werden können. Um die hierfür notwendige heterologe Expression aller Kombinationen in möglichst vielen Organismen zu ermöglichen, wurde zunächst ein passender Vektor entwickelt.

### 3.1.1 Erstellung eines Zielvektors

Für eine möglichst breite Anwendung dieser Methode, sollte ein Vektor erstellt werden, welcher

1. Eine gleichmäßige Kombination der Module ermöglicht
2. Stabil in einer Vielzahl von Organismen repliziert und exprimiert werden kann
3. Durch Konjugation auch in genetisch schwer zugängliche Organismen eingebracht werden kann

Eine gleichmäßige Kombination der Module sollte durch eine markerlose Ligation von DNA-Fragmenten in äquimolaren Mengen erfolgen, auf denen sich die Gene der einzelnen Modulvarianten befinden. Durch die Unterschiede in Größe und Sequenz der Fragmente ist jedoch mit einem Selektionsdruck auf verschiedene Kombinationen bei der Replikation in Bakterien zu rechnen, allein aufgrund der Replikationsmaschinerie und der metabolischen Belastung bei einer Basalexpression. Dieser Selektionsdruck verringert sich, wenn die Plasmide in einem Eukaryoten gesichert werden, welcher die Promotoren und Gensequenzen nicht als solche erkennt und eine effiziente Replikationsmaschinerie besitzt. Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* erfüllt diese Bedingungen und bietet außerdem den Vorteil einer effektiven homologen Rekombination von DNA-Fragmenten. Eine spezifische Kombination der Module in einer festgelegten Reihenfolge ist somit durch die Wahl homologer Sequenzen an

den zusammengehörigen Enden der Modul-Fragmente möglich. Für eine Replikation in *S. cerevisiae* und die anschließende Selektion auf eine Replikation des Plasmids sind daher Gene für den  $2\mu$ m-Replikationsursprung sowie das Markergen *ura3* aus dem Plasmid pMQ97 übernommen worden (Shanks *et al.*, 2006).

Für den stabilen und funktionalen Transfer in verschiedenen Organismen wurden Gene gewählt, welche eine Replikation, Selektion und Expression in den meisten bekannten Gram-negativen Bakterien ermöglicht. Für die Replikation fiel die Wahl auf die *broad-host* Replikationsgene aus pBBR1MCS-2. Diese beinhalten ein Replikationsfaktor (*rep*) und einen Replikationsursprung (*OriV*). Ebenfalls findet sich auf diesem Plasmid eine Kanamycin-Resistenz, welche in den meisten Bakterien funktional ist (Kovach *et al.*, 1995). Zusätzlich handelt es sich bei Kanamycin um einen Selektionsfaktor, der eine hohe Stabilität unter verschiedensten Bedingungen wie hohen Temperaturen, komplexen Medien und extremen pH-Werten zeigt (Riley *et al.*, 2021). Die *mobility*-Region, welche ebenfalls von pBBR stammt, ermöglicht die Konjugation des Plasmids aus einem Konjugationsstamm in Organismen, für welche andere Transformationstechniken ineffizient sind (Kovach *et al.*, 1995). Schließlich wurde für eine induzierbare Expression der Elektronentransfergene der gut charakterisierte und ebenfalls in einer Vielzahl von Organismen funktionale Arabinose-Promotor mit dem Regulatorgen (*araC*) aus dem pBAD-Operon gewählt (Newman *et al.*, 1999). Für eine Insertion weiterer Gene wurde nach dem Promotor eine P<sub>meI</sub>-Erkennungssequenz eingefügt. Die Sequenzen vor und nach der Schnittstelle sind identisch zu denen aus pBAD202, was einen einfachen und schnellen Transfer von Genen zwischen den Plasmiden auf Basis homologer Sequenzen ermöglicht. Das resultierende Plasmid wurde pHCA genannt. Eine schematische Darstellung der Klonierungsstrategie ist Abbildung 3.1 zu entnehmen.

### Funktionalitätstest von pHCA

Für einen Test auf Funktionalität und optimale Induktionsstärke des Plasmids, wurde *eyfp* als Reportergen integriert. Die Integration wurde mittels Sanger-Sequenzierung sichergestellt. Kulturen, deren Wachstum über elf Stunden gemessen wurde, wurden mit verschiedenen Arabinose-Konzentrationen (0, 50  $\mu$ M, 250  $\mu$ M und 1250  $\mu$ M) induziert. Die Fluoreszenz von eYFP der Kulturen wurde stündlich während des Wachstums nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 515 nm gemessen. Die Emission wurde bei 535 nm gemessen. Als Expressionsstamm diente hier *E. coli* DH10B, welcher in LB mit Kanamycin kultiviert wurde. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.2 dargestellt. Eine Fluoreszenz konnte bei jeder Induktionsstärke gemessen werden. Da keine signifikanten Unterschiede im Wachstum zwischen den Induktionsstärken gemessen werden konnte, wurde fortan mit einer Arbeitskonzentration von 500  $\mu$ M induziert.

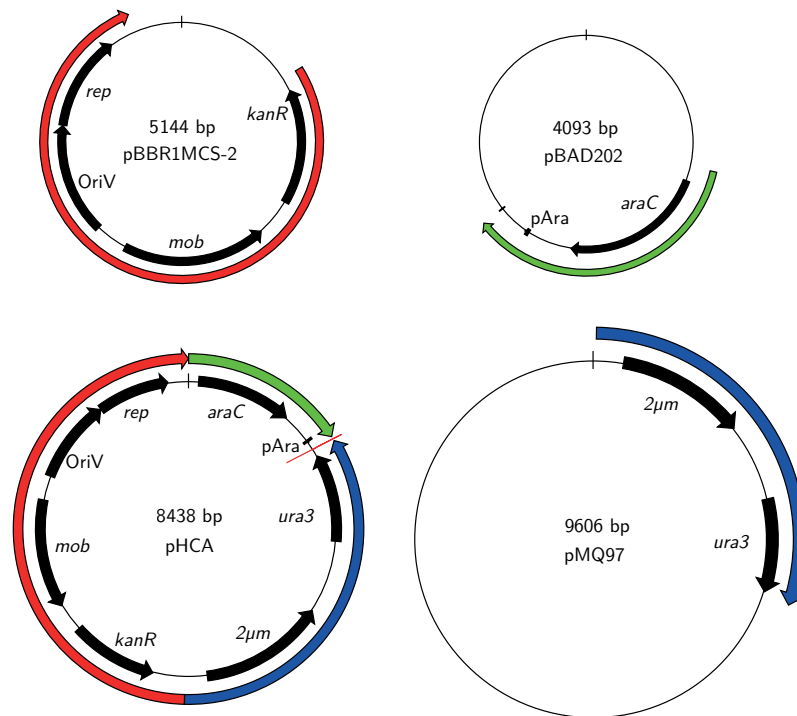


ABBILDUNG 3.1: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie von pHCA. Teile der Plasmide pBBR1MCS-2 (rot), pBAD202 (grün) und pMQ97 (blau) wurden für dessen Konstruktion zusammengesetzt. Die Pmel-Erkennungssequenz welche für die Insertion weiterer Gene diente ist durch eine rote Linie in pHCA gekennzeichnet.

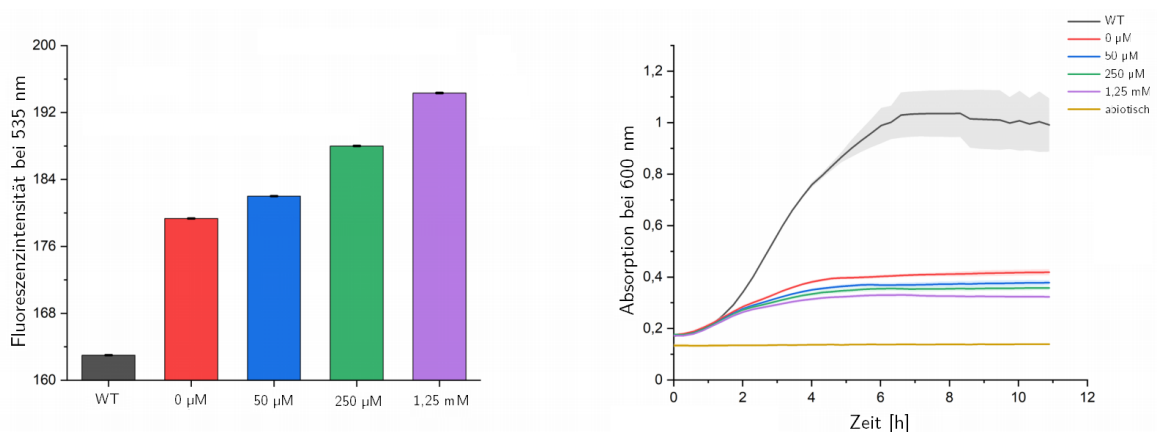


ABBILDUNG 3.2: Induktionsstudie des Proteins eYFP in pHCA. Für die Induktion während einer elfstündigen Wachstumskurve wurden Arabinosekonzentrationen von 0, 50, 250 und 1250 µM getestet. Links: Die Fluoreszenzintensität bei 535 nm nach 3 h. Rechts: Das Zellwachstum wurde stündlich durch die Absorption bei 600 nm gemessen.

### 3.1.2 Simultane Klonierung synthetischer EET-Ketten

Als Vorlage für die Konstruktion von synthetischen extrazellulären Elektronentransportketten wurden Gene aus *S. oneidensis*, *S. lithotrophicus* und *R. palustris* (siehe Abschnitt 1.3) gewählt. Da die Elektronenaufnahme in *R. palustris* durch das Photosystem I in der inneren Membran auf Lichtenergie angewiesen ist, wurde stattdessen als Variante in der inneren Membran das Gen für NapC aus *E. coli* gewählt. Für NapC ist eine teilweise funktionelle Homologie zu CymA beschrieben (Gescher *et al.*, 2008). Da der EET in *S. oneidensis* zusätzlich von einem äußeren Membrancytochrome wie MtrC abhängig ist, wurde eine Mutation von *mtrAB* gewählt, welche unabhängig davon eine Eisen(III)reduktion zeigt - *mtrAB<sup>s</sup>* (Bücking *et al.*, 2012). Die Elektronentransportkette kann schließlich in jedem Fall in drei Module unterteilt werden:

1. ein Protein welches in der inneren Membran zur Oxidation bzw. Reduktion des Chinonpools verankert ist (IM)
2. ein lösliches Elektronenshuttle im Periplasma (PP)
3. sowie ein Komplex aus zwei Proteinen in der äußeren Membran (OM), welche einen Elektronentransport von bzw. zu einem unlöslichen Substrat ermöglichen.

Für jedes Modul existieren zugleich drei Varianten. Die gezielte Kombination der Modul-kodierenden DNA-Sequenzen erfolgt durch einen überlappenden Bereich am Ende jedes Fragments, welcher homolog zum Bereich des darauffolgenden Modulfragments ist. Im überlappenden Bereich zwischen dem ersten (OM) und zweiten Modul (PP) wurde zusätzlich eine *Shine-Dalgarno*-Sequenz eingefügt, um eine erhöhte Translation folgender Gensequenzen zu sichern. Ein Schema der Klonierungsstrategie ist in Abb. 3.3 dargestellt.

In diesem synthetischen Ansatz mit je drei Varianten in drei Modulen lassen sich theoretisch  $3^3 = 27$  verschiedene Konstrukte in einem Schritt zusammensetzen. Unter der Annahme einer Gleichverteilung findet sich jedes Konstrukt mit einer Wahrscheinlichkeit von  $P = 1 - (1 - \frac{1}{27})^n$  in einer Mischkultur aus n individuellen Mutanten. Für ein Signifikanzniveau von über 99,95 % wurde daher für eine weitere Charakterisierung einer Mischkultur stets darauf geachtet mindestens 202 individuelle ursprüngliche Kolonien zu verwenden.

#### Sequenzierung

Die initiale Klonierung des Plasmids erfolgte in *S. cerevisiae*. Da die Plasmidisolierung jedoch nur eine geringe Ausbeute erbrachte, erfolgte direkt eine Retransformation in den Konjugationsstamm *E. coli* WM3064. Um den Erfolg der Klonierung zu überprüfen, sollten die Kombinationen möglichst vieler Plasmide in einem Ansatz bestimmt werden. Als geeignete Methode wurde die Sequenzierung einer Plasmidisolierung gewählt.

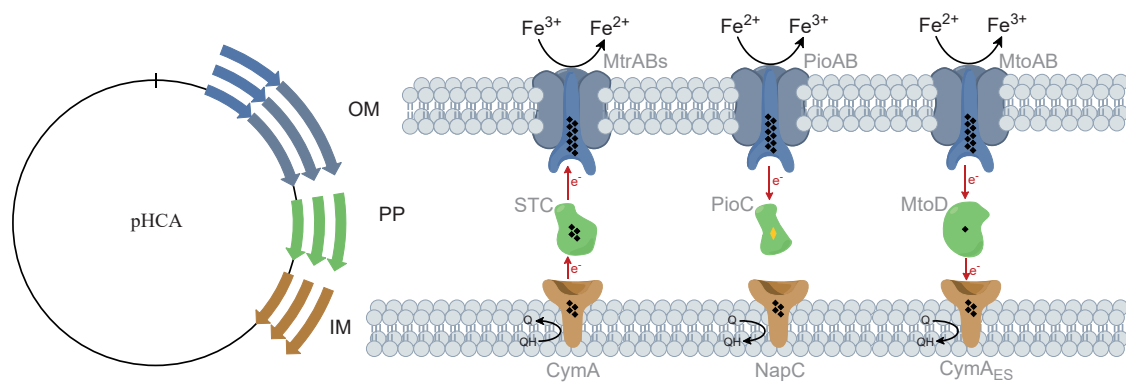


ABBILDUNG 3.3: Rechts: Schematische Darstellung der Extrazellulären Elektronentransportmodule aus *S. oneidensis* (CymA, STC, MtrAB<sup>s</sup>), *R. palustris* (PioC, PioAB), *E. coli* (NapC) und *S. lithotrophicus* (CymA<sub>ES</sub>, MtoD, MtoAB). Links: Die gezielte Kombination der Modulgene in pHCA durch eine überlappspezifische Rekombination. Im ersten Modul sind Gene für den äußeren Membrankomplex (OM - blau) integriert, im zweiten Modul Gene für einen periplasmatischen Elektronencarrier (PP - grün), im dritten Modul Gene für eine Chinoloxidase in der inneren Membran (IM). Hämgruppen sind durch schwarze Rauten gekennzeichnet, das Eisen-Schwefel-Cluster in PioC durch eine gelbe Raute.

Aufgrund der homologen Bereiche in allen Konstrukten, ist eine Sequenzierung mit langen *reads* notwendig und erfolgte daher mittels Nanopore-Sequenzierung (Abs. 2.5.3). Die Sequenziererergebnisse wurden mit Hilfe eines reversen BLAST wie in Abschnitt 2.6.1 beschrieben ausgewertet. Die statistische Verteilung der einzelnen Kombinationen des initialen Plasmidsets ist in Abb. 3.4 dargestellt. In dieser Sequenzierung konnten jeweils 2424 *reads* einer kompletten Modulkombination zugeordnet werden. Von den 27 theoretischen Konstrukten konnten 23 Konstrukte nachgewiesen werden. Die fehlenden Konstrukte bestehen aus den Kombinationen

*mtoAB, mtoD, napC*; *mtoAB, pioC, napC*; *pioAB, pioC, napC* *mtrAB<sup>s</sup>, stc, napC*.

Um die funktionale Replikation und Transformation dieses Plasmidsets in verschiedenen Organismen zu zeigen, wurde dieses ausgehend vom Konjugationsstamm *E. coli* WM3064 in *S. oneidensis* und *C. necator* transferiert. Außerdem wurde das Plasmidset auch direkt durch Elektroporation in einen *E. coli* DH10B transformiert. Die Sequenziererergebnisse der isolierten Plasmide aus diesen Organismen sind analog zur vorher beschriebenen Vorgehensweise in Abb. 3.5 dargestellt. In *E. coli* DH10B finden sich 22, in *S. oneidensis* 16 und in *C. necator* 15 Konstrukte.



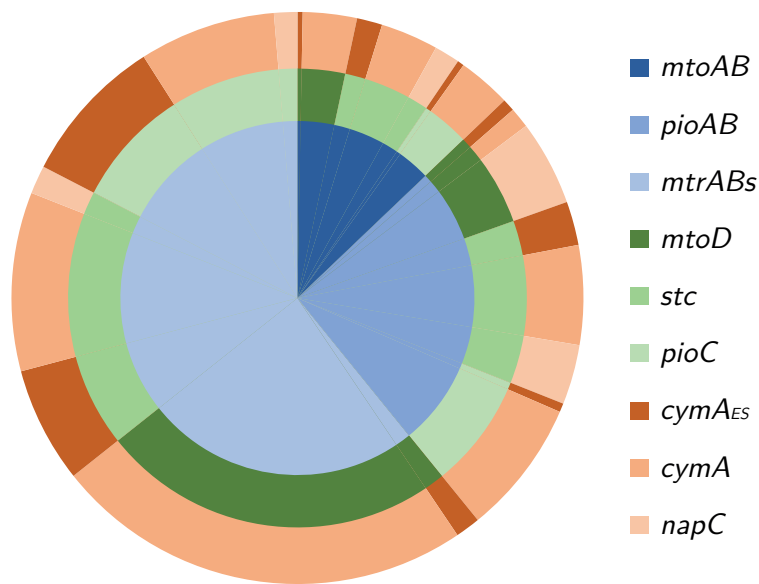


ABBILDUNG 3.4: Statistische Verteilung der Plasmide nach einer Transformation in *E. coli* WM3064. Der Anteil einer Genkombination am Gesamtset wird durch den äußeren Kreis dargestellt. Durch die Kombination mit den inneren Kreisen werden die Genkombinationen erläutert. Die Kombinationen wurden dafür zunächst nach dem äußeren Membranmodul (blau) und sekundär durch das periplasmatischen Modul (grün) entsprechend Abb. 3.3 sortiert. Farbabstufungen repräsentieren eine Genvariante des jeweiligen Moduls.

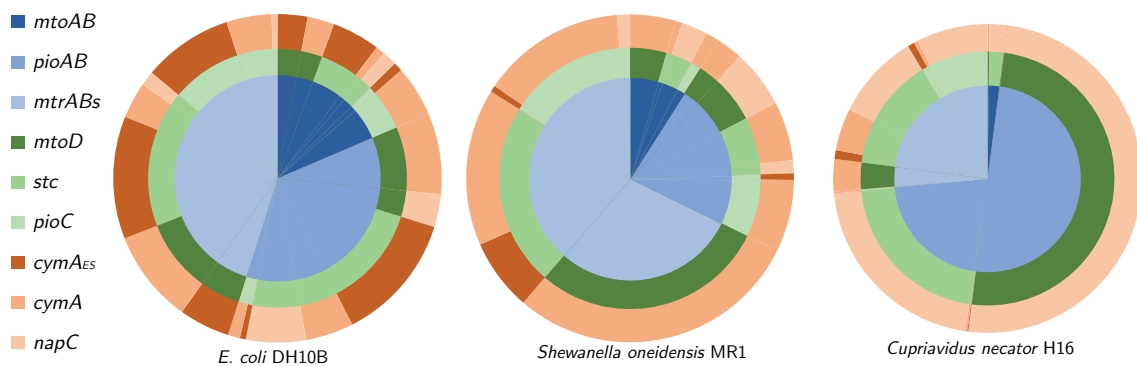


ABBILDUNG 3.5: Statistische Verteilung der Plasmide mit verschiedenen Modulkombinationen in den Organismen *E. coli*, *S. oneidensis* und *C. necator*. Der Anteil einer Genkombination am Gesamtset wird durch den äußeren Kreis dargestellt. Durch die Kombination mit den inneren Kreisen werden die Genkombinationen erläutert. Die Kombinationen wurden dafür zunächst nach dem äußeren Membranmodul (blau) und sekundär durch das periplasmatischen Modul (grün) entsprechend Abb. 3.3 sortiert. Die Farbabstufungen repräsentieren eine Genvariante des jeweiligen Moduls. Die Zahlenwerte hierzu finden sich im Anhang in Tab. A.1

### 3.1.3 Test auf Funktionalität in *S. oneidensis*

Die funktionale Expression, sowie die Möglichkeit einer Selektion auf ein passendes Plasmidset wurde in einer *S. oneidensis*-Deletionsmutante ( $\Delta$ EET) nachgewiesen. In diesem Stamm wurden sämtliche Gene, welche als Minimalset für den EET gelten, deletiert. Neben den Genen, welche sich auch in den Plasmiden wiederfinden, wurde zusätzlich das *fccA*-Gen deletiert, da FccA eine funktionelle Homologie zu STC aufweist (Sturm, 2014). Die Funktionalität des Systems wurde durch die Eisenreduktionsrate der Kultur nachgewiesen. Da in dieser Kultur verschiedene Gensets vorhanden sind, welche vermutlich unterschiedlich gut für eine Eisenreduktion geeignet sind, erfolgte eine Selektion auf die geeignetste Kombination. Die Selektion erfolgte durch mehrere Überführungen auf Medium mit Fe(III)-Citrat als einzigem Elektronenakzeptor. Die Eisenreduktionsrate der einzelnen Überführungen ist in Abbildung 3.6 dargestellt. Nach der siebten Überführung wurde eine Plasmid isolation dessen sequenziert.

Als Ergebnis trugen 100 % der Plasmidinserts die Kombination der Gene *mtrAB<sup>s</sup>*, *stc*, *cymA*.

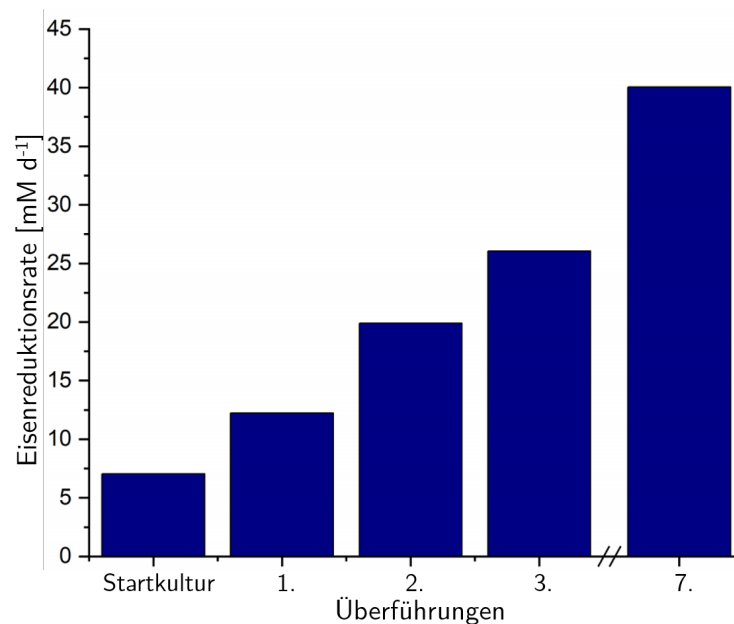


ABBILDUNG 3.6: Eisenreduktion durch Selektion eines EET-Plasmidsets auf Fe(III) Citrat in *S. oneidensis*  $\Delta$ EET. Die Fe(II)-Konzentration wurde zwischen jeder Überführung bestimmt. Jede Überführung wurde mit 0,1 % der jeweiligen Vorkultur beimpft. Zur besseren Übersicht sind nur die Reduktionsraten der ersten drei und der letzten Überführung gezeigt.

Parallel wurde die Deletionsmutante ohne Plasmide im selben Medium kultiviert. Diese zeigte auch nach zwei Wochen keine Eisenreduktionsaktivität.

### 3.1.4 Heterologe Expression in *E. coli*

Um die Methode nun zu testen, sollte ein *screening* im Modellorganismus *E. coli* durchgeführt werden. Der Stamm DH10B wurde verwendet, da er eine Mutation im *araD*-Gen besitzt und die Metabolisierung des Induktors Arabinose blockiert ist. Dieser Stamm wurde daher für den hier gezeigten Versuch verwendet. Neben dem Plasmidset wurde das Plasmid pEC86 für die Maturation der *c*-Typ Cytochrome in diesen Stamm transformiert. Um auf die am besten passende Modulkombination zu selektieren, wurde diese Kultur auf M9-Minimalmedium mit Fe-NTA als Elektronenakzeptor kultiviert. Von dieser Startkultur wurden 5 weitere Überföhrungen vorgenommen. Für eine Überföhrung wurden jeweils 0,2 % der Kultur in frisches Medium überföhrte. Nach der letzten Überföhrung wurde ein Teil der Kultur in LB-Medium kultiviert und komplett geerntet. Von einem Teil dieser Kultur wurde eine Plasmidsequenzierung durchgeführt. Der Rest der Kultur wurde in Minimalmedium überföhrte um die Eisenreduktionsrate zu bestimmen. Das Medium wurde auf eine optische Dichte von 0,1 angeimpft, über 20 h konnte hierbei kein Wachstum beobachtet werden (s. Anhang, Abb. A.1). Die Eisen(II)-Konzentration im Verlauf der Zeit ist in Abbildung 3.7 dargestellt. Die Kultur wurde in jedem Schritt mit 500  $\mu\text{M}$  Arabinose und 0,43  $\mu\text{M}$  Anhydrotetracyclin induziert. Simultan wurden sämtliche Schritte mit einer Kontrollkultur durchgeführt, welche lediglich das Plasmid mit *ccm*-Genen trägt.

Als Ergebnis enthielten 100 % der Plasmidinserts die Kombination *pioAB*, *stc*, *cymA*.

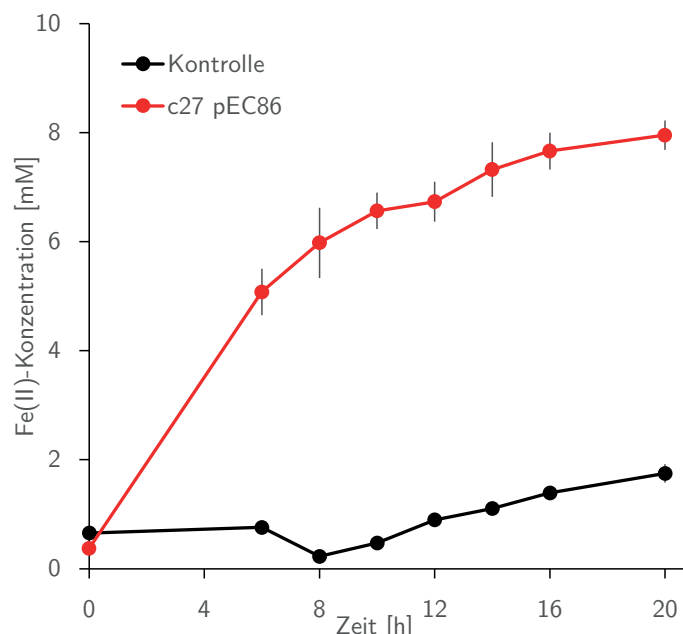


ABBILDUNG 3.7: Eisenreduktion einer vorselektierten *E. coli* Kultur auf Fe(III)-NTA. Gezeigt ist die Fe(II)-Konzentration im Verlauf von 20 h in einer Kultur, welche das Plasmidset, sowie pEC86 mit *ccm*-Genen trägt und einer Kontrollkultur, welche lediglich pEC86 trägt.

## 3.2 Identifikation natürlicher EEA-Mechanismen

Um neue Mechanismen eines extrazellulären Elektronentransports zu identifizieren wurde im Rahmen eines Studierendenprojekts eine Anreicherung auf Kathoden in einer 25 cm tiefen Erdschicht durchgeführt. Je zwei Graphitvliese mit einer Fläche von 50 x 100 cm wurden dafür in der Erde eines Beets im botanischen Garten des Karlsruher Institut für Technologie eingesetzt (Koordinaten 49.012371, 8.418916). Über einen Zeitraum von drei Monaten wurde am oberen Vlies ein konstantes Potenzial von -500 mV (vs. SHE) angelegt. Das untere Graphitvlies in 50 cm Tiefe diente als Gegenelektrode. Diese Anreicherung wurde im Duplikat in zwei nebeneinander liegenden Feldern mit einem Abstand von einem Meter durchgeführt, erfolgte im Zeitraum vom 18.06.2018 bis zum 18.10.2018 und wurde im folgenden Jahr im Zeitraum vom 05.07.2019 bis zum 05.11.2019 wiederholt. Als Kontrolle wurden zusätzlich Graphitvliese in der selben Tiefe eingesetzt, an die jedoch kein Potenzial angelegt wurde. Eine schematische Abbildung, sowie eine Lichtfotografie des Aufbaus sind in Abb. 3.8 dargestellt.

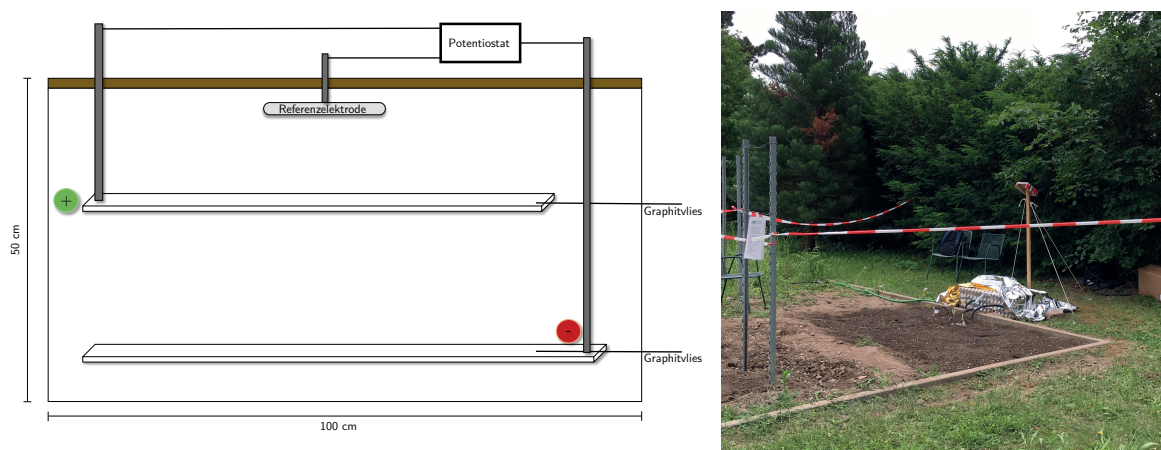


ABBILDUNG 3.8: Schematische Darstellung und Fotografie des Aufbaus zur Anreicherung kathodischer Mikroorganismen im Erdreich.

### 3.2.1 Sequenzierergebnisse

Um das mikrobielle Konsortium auf den Kathoden zu beschreiben, wurden Proben des Biofilms genommen, indem Teile des Graphitvlieses ausgeschnitten und für eine Nukleinsäure-Aufreinigung vorbereitet wurden. Durch eine mechanische Behandlung mit Glaskugeln, wurden die Zellen aufgelöst und die DNA bzw. RNA aufgereinigt (s. Abs. 2.4.2-3). Eine Nanopore-Sequenzierung des Metagenoms wurde für eine Beschreibung des mikrobiellen Konsortiums durchgeführt. Die Ergebnisse der ungefilterten und gefilterten *reads*, sowie Statistiken der Genom-Assemblierung (s. Abs. 2.6.2) sind in Tabelle 3.1 dargestellt.

Der *N50*-Wert eines Metagenoms entspricht dem Median einer Probe, ist jedoch zugleich abhängig von der *read*-Länge. Er repräsentiert somit die Größe des kleinsten *reads* bei der Hälfte der Gesamtgenom-Länge.

TABELLE 3.1: Sequenzierergebnisse des Metagenoms und Metatranskriptoms. Zunächst ist die Anzahl der Nanopore-*reads*, sowie deren durchschnittliche Länge vor und nach Filterung aufgelistet. Für Genome sind die Werte der absoluten Größe, der Anzahl an *contigs*, dem *N50*-Wert der *contigs*, sowie die durchschnittliche Abdeckung des Genoms gelistet. Für Transkriptome sind die Anzahl an *reads* dargestellt, vor und nach dem Filtern, sowie die Anzahl an *reads*, welche auf kodierende Bereiche (CDS) des kombinierten Gesamtgenoms *gemapped* werden konnten. Die Datensets repräsentieren Duplikate zweier Versuche aus den Jahren 2018 und 2019 (A+B) sowie je einer Kontrolle (C). Für Kontrollproben wurde kein Transkriptom angefertigt.

Datensatz	2018 <sub>A</sub>	2018 <sub>B</sub>	2018 <sub>C</sub>	2019 <sub>A</sub>	2019 <sub>B</sub>	2019 <sub>C</sub>
<b>rawreads</b>	2,6 Mio	2,0 Mio	1,3 Mio	2,6 Mio	3,4 Mio	1,3 Mio
$\bar{x}$ <i>read</i> -Länge	2,3 kbp	2,6 kbp	2,4 kbp	2,0 kbp	1,9 kbp	2,3 kbp
<b>nach Filtern</b>	1,5 Mio	1,2 Mio	0,7 Mio	1,2 Mio	1,6 Mio	0,8 Mio
$\bar{x}$ <i>read</i> -Länge	3,6 kbp	3,8 kbp	3,7 kbp	3,5 kbp	3,3 kbp	3,8 kbp
<b>Metagenom</b>						
Größe	34 Mbp	23 Mbp	6 Mbp	31 Mbp	46 Mbp	7 Mbp
<i>contigs</i>	1055	625	227	852	1379	292
<i>N50</i>	36 kbp	49 kbp	29 kbp	147 kbp	53 kbp	30 kbp
<i>coverage</i>	16x	19x	7x	30x	20x	9x
<b>Metatranskriptom</b>						
<i>reads</i>	74 Mio	94 Mio	–	96 Mio	82 Mio	–
nach Filtern	73 Mio	93 Mio	–	96 Mio	82 Mio	–
CDS <i>mapped</i>	15 Mio	19 Mio	–	15 Mio	18 Mio	–

### 3.2.2 Phylogenetische Analyse

Der Vorteil langer Sequenzier*reads* bietet in diesem Kontext eine Assemblierung großer *contigs*. Ein Problem bei Genomsequenzierungen mit kurzen *reads*, sind die Assemblierung chimärer Sequenzen, welche aufgrund hochkonservierter Regionen zwischen nah verwandten Spezies entstehen. Da in einer Nanoporesequenzierung einzelne *reads* auch komplette, hochkonservierte Gencluster wie rRNA-Operons überspannen können, lässt sich der Anteil chimärer Sequenzen reduzieren. Jedoch handelt es sich bei der Nanoporesequenzierung um eine recht junge Technologie, welche durch eine vergleichsweise hohe Fehlerrate von 5-15 % gekennzeichnet ist. Mit einer ausreichenden Sequenziertiefe, lässt sich diese jedoch durch eine Konsensuskorrektur auf unter 0,5 % senken. Vor einer Analyse der Daten wurden die *reads* daher miteinander abgeglichen und die Sequenzen entsprechend korrigiert.

Für eine phylogenetische Analyse des Konsortiums sollte eine möglichst große Datengrundlage genutzt werden, welche zugleich keine zu große Rechenzeit in Anspruch nimmt und robust gegenüber einzelnen Sequenzierfehlern ist. Daher wurden proteinkodierende Bereiche auf den konsensuskorrigierten *reads* identifiziert und die translatierte Sequenz mit der Uniprot KB Datenbank abgeglichen. Der wahrscheinlichste Treffer wurde für eine phylogenetische Einordnung genutzt. Ein weiterer Vorteil der Nanoporesequenzierung ist die Sequenzierung nativer DNA. Im Gegensatz zur Illuminasequenzierung kommt es nicht zu einer Verschiebung der tatsächlichen Abundanz eines DNA-Fragments durch eine PCR. Die rohen Sequenzierdaten spiegeln daher besser die Phylogenie in einem mikrobiellen Konsortium wieder.

Die Ergebnisse der phylogenetischen Einordnung sind in Abb. 3.9 dargestellt. Zur besseren Übersicht wurden die Daten auf phylogenetischen Ebenen zusammengefasst, welche mindestens 5 % einer Probe darstellen oder in späteren Analysen auffällig wurden. Zugleich wurde maximal bis zur Stammebene zusammengefasst (originale Verteilung im Anhang Abb. A.2).

### **Erstellung eines substraktiven Genoms**

Um Spezies und Gene zu identifizieren, welche ausschließlich oder vermehrt auf einer Kathode erscheinen, wurde ein mapping der kathodischen Sequenzierdaten gegen die Kontrollsequenzierungen durchgeführt. *Reads* für welche keine ähnlichen Sequenzen in den Kontrollsequenzen gefunden wurden, wurden zu einem weiteren, substraktiven Genom zusammengefasst. Dieses substraktive Genom besteht aus 2,7 Millionen *reads* mit einer durchschnittlichen Länge von 2,9 kbp. Eine Analyse der phylogenetischen Annotation ist, wie zuvor beschrieben, in Abb. 3.10 dargestellt. Eine Assemblierung dieser *reads* ergab ein Metagenom aus 676 *contigs* mit einem *N50*-Wert von 25 kbp und einer Größe von 14 Mbp.

Wie aus Abbildung 3.10 deutlich wird, sind an den Kathoden Gammaproteobakterien und darunter insbesondere Chromatiales angereichert. Um nun eine genauere Aussage über die Phylogenie zu treffen, wurden *contigs* mit einer Länge über 200 kbp basierend auf den annotierten Genen zugeordnet. Die meisten dieser *contigs* konnten eindeutig einem Organismus zugeordnet werden. Die Annotation zeigt dabei in jedem Fall die nächste Verwandtschaft zu „*Ca. Tenderia electrophaga*“. Wie in Abschnitt 1.4.3 beschrieben, handelt es sich hierbei um ein bisher unkultiviertes Bakterium, welches durch eine kathodische Kultivierung mit Proben aus marinen Sedimenten angereichert werden konnte. Da dieses Bakterium dominant in der marinen Anreicherung ist, wurde es in der Studie von Wang *et al.*, 2015 als Schlüsselement für die kathodische Interaktion betrachtet. Basierend auf Genom- und Transkriptomanalysen wurde ein Elektronentransportmechanismus in Abhängigkeit von mehreren *c*-Typ Cytochromen postuliert. Da für „*Ca. Tenderia electrophaga*“ eine vollständige Genomsequenzierung vorliegt, wurden 10 *contigs*, welche die größte Ähnlichkeit aufwiesen, in einem *alignment* mit dem "*Ca. Tenderia electrophaga*" Genom verglichen.

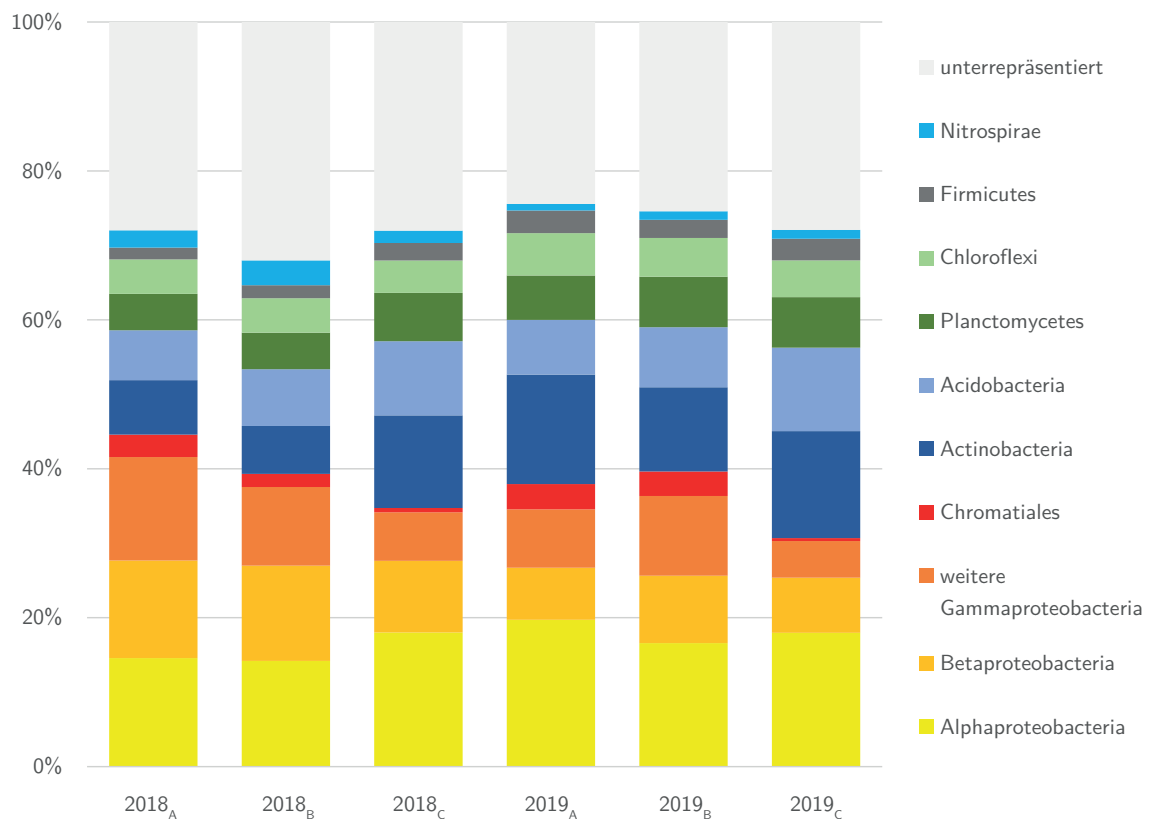


ABBILDUNG 3.9: Graphische Darstellung der phylogenetischen Diversität in kathodischen Anreicherungskulturen (A+B) und nicht-kathodischen Kontrollkulturen (C), basierend auf Genomsequenzierungen. Die Balken repräsentieren den Anteil an proteinkodierenden Genen auf *reads*, welche einem Organismus zugeordnet werden konnten. Zur Übersicht wurden Organismengruppen zusammengefasst, wenn diese nicht näher zugeordnet werden konnten oder allein unterrepräsentiert sind.

Das *alignment* beider Datensätze ist in Abb. 3.11 dargestellt. Die Ähnlichkeit beider Genome kann durch die *average nucleotide identity* (ANI) abgebildet werden. Die ANI zwischen den *contigs* und dem Referenzgenom beläuft sich in diesem Fall auf einen Wert von 83%. Aus einem der *contigs* konnte ebenfalls eine 16S-rDNA-Sequenz isoliert werden. Ein BLAST ergab eine Identität von 94,25 % zur nächst verwandten Spezies, „*Ca Tenderia electrophaga*“. Die Beurteilung der Vollständigkeit des Genom basierend auf diesen *contigs* lieferte einen Wert von 87,7 %.

Die meisten Gene und *contigs*, welche bisher den Gammaproteobakterien und Chromatiales zugeordnet wurden, können mit hoher Wahrscheinlichkeit diesem einen Vertreter zugeordnet werden. Im Folgenden werden diese daher einem neuen Vertreter der Chromatiales zugeordnet, welcher als „*Cd. Tenderia* sp.“ bezeichnet wird, auch wenn eine endgültige phylogenetische Zuordnung aussteht.

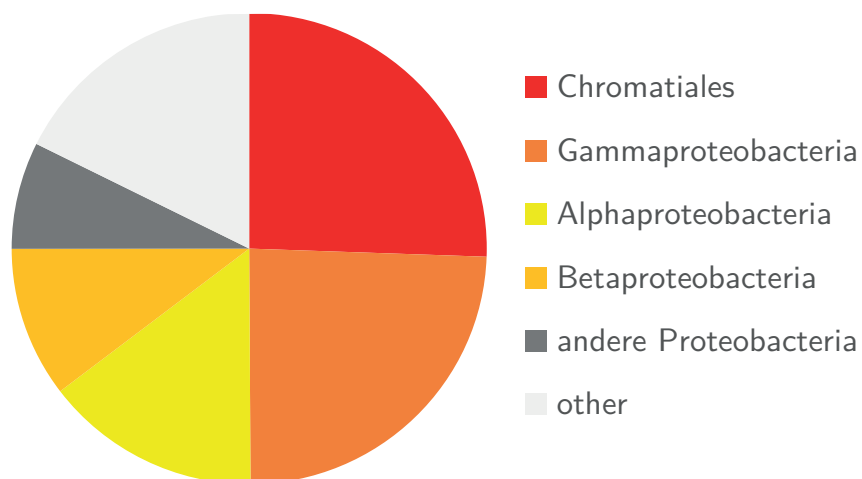


ABBILDUNG 3.10: Graphische Darstellung der phylogenetischen Diversität des substraktiven Genoms. Die phylogenetische Analyse basiert auf annotierten Genen und repräsentiert somit DNA-Fragmente von Genen, welche exklusiv auf einer Kathode identifiziert wurden.

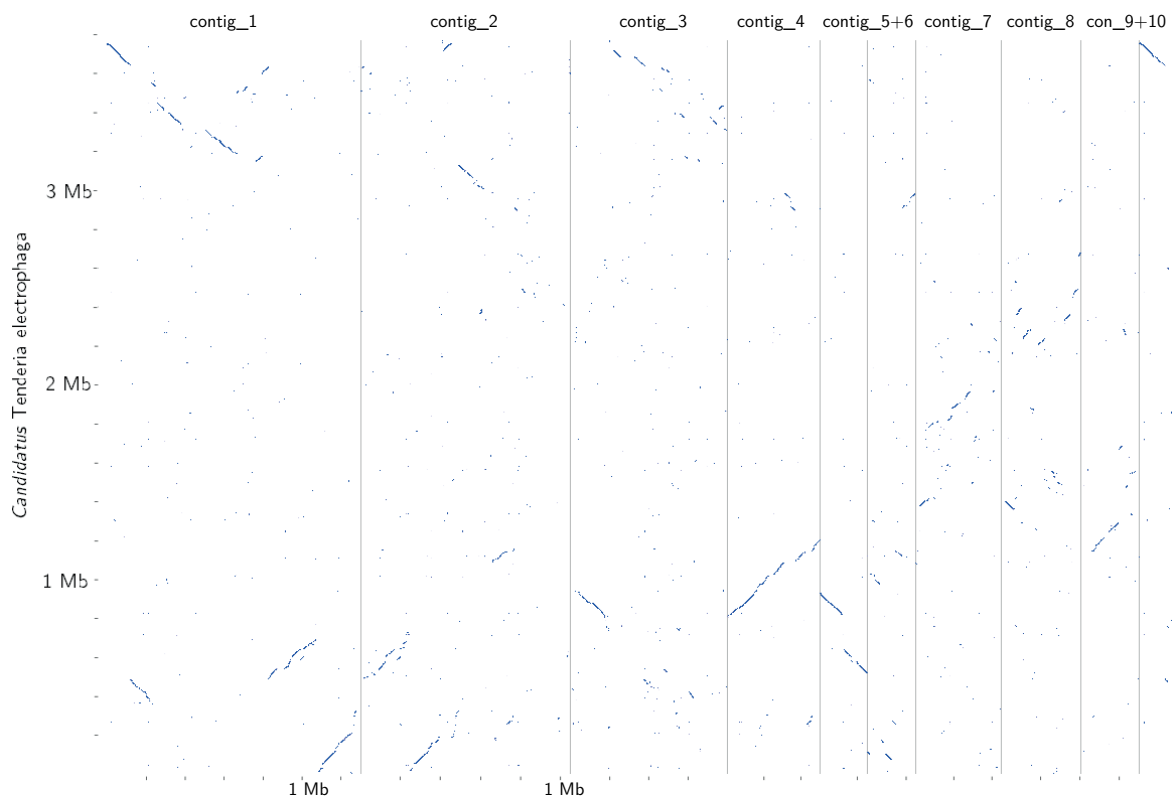


ABBILDUNG 3.11: Genomcontigs *alignment* zum Genom von „*Cd. Tenderia electrophaga*“. Insgesamt wurden 10 *contigs* identifiziert (X-Achse), welche eine hohe Ähnlichkeit zum Referenzgenom (y-Achse) aufweisen. Homologe Bereiche sind durch blaue Punkte und Linien gekennzeichnet. Genomabschnitte von je 200 kbp sind an den Achsen gekennzeichnet. Einzelne *contigs* sind durch vertikale Striche voneinander getrennt.



### 3.2.3 Metatranskriptom-Analysen

#### Erstellung einer Referenz

Für weitere, funktionelle Analysen von Schlüsselementen an der Kathode in Kombination mit den Transkriptomdaten, sollte ein möglichst präzises Referenzgenom geschaffen werden. Für die Assemblierung wurden alle nanopore-*reads*, aller sechs Proben zusammengefasst und assembliert. Nach einer Konsensussequenzkorrektur des Genoms und einer Korrektur Homopolymer-verursachter Sequenzierfehler, wurden die Illumina-*reads* des Transkriptoms für ein *polishing* verwendet. Da diese *reads* lediglich RNA-Fragmente repräsentieren, werden nur transkribierte Bereiche des Genoms korrigiert, welche für eine funktionelle Analyse und für ein *mapping* der Metatranskriptom-*reads* benötigt werden. Das neu assemblierte Metagenom aus allen Datensätzen besitzt eine Gesamtgröße von 354 Mbp und setzte sich aus 13470 *contigs* mit einem *N50*-Wert von 34 kbp zusammen. Insgesamt ergab sich in diesem Metagenom eine durchschnittlich 15-fache Abdeckung durch einzelne nanopore-*reads*. Eine Annotation erfolgte ebenfalls durch einen Abgleich kodierender Sequenzen mit der Uniprot KB Datenbank.

Nach einer ersten phylogenetischen Einteilung der *contigs* auf Basis der annotierten Gene erfolgte ein *binning* der *contigs* mit MetaBAT. Bei Bedarf wurde die phylogenetische Zuordnung zusätzlich durch eine manuelle Analyse der Abdeckung von Genom- und Transkriptom-*reads* im Vergleich der verschiedenen Proben korrigiert.

#### Vergleichende Metatranskriptomanalyse

Um eine Aussage über die metabolischen Stoffwechselwege an der Kathode treffen zu können, wurden Transkriptome für jede kathodische Probe angefertigt. Hierfür wurde aufgrund der höheren *read*-Ausgabe und der geringeren RNA-Ausbeute welche benötigt wird, eine Illuminasequenzierung durchgeführt. Zusätzlich ermöglicht die geringe Fehlerrate eine zusätzliche Korrektur kodierender Bereiche im Metagenom. Die Anzahl der *reads* pro Probe, vor und nach dem Filtern, sowie der Anteil der auf das Referenzgenom *mapped* sind in Tabelle 3.1 gelistet. Das *mapping* und die Berechnung der TPM-Werte erfolgte mit Kallisto.

Zunächst wurden nur Gene betrachtet, welche in mindestens zwei Datensätzen exprimiert wurden, um den Datensatz der Metatranskriptome zu reduzieren. Eine phylogenetische Aussage über die aktivsten Organismen an einer Kathode wurde durch eine Aufsummierung der TPM-Werte erreicht, welche diesem Organismus zugeordnet werden konnten. Zur Übersicht wurden wiederum Gruppen maximal bis zur Stammebene zusammengefasst, welche allein unter 5 % der Transkripte ausmachen. Die Zusammenfassung dieser Daten ist in Abbildung 3.12 dargestellt.

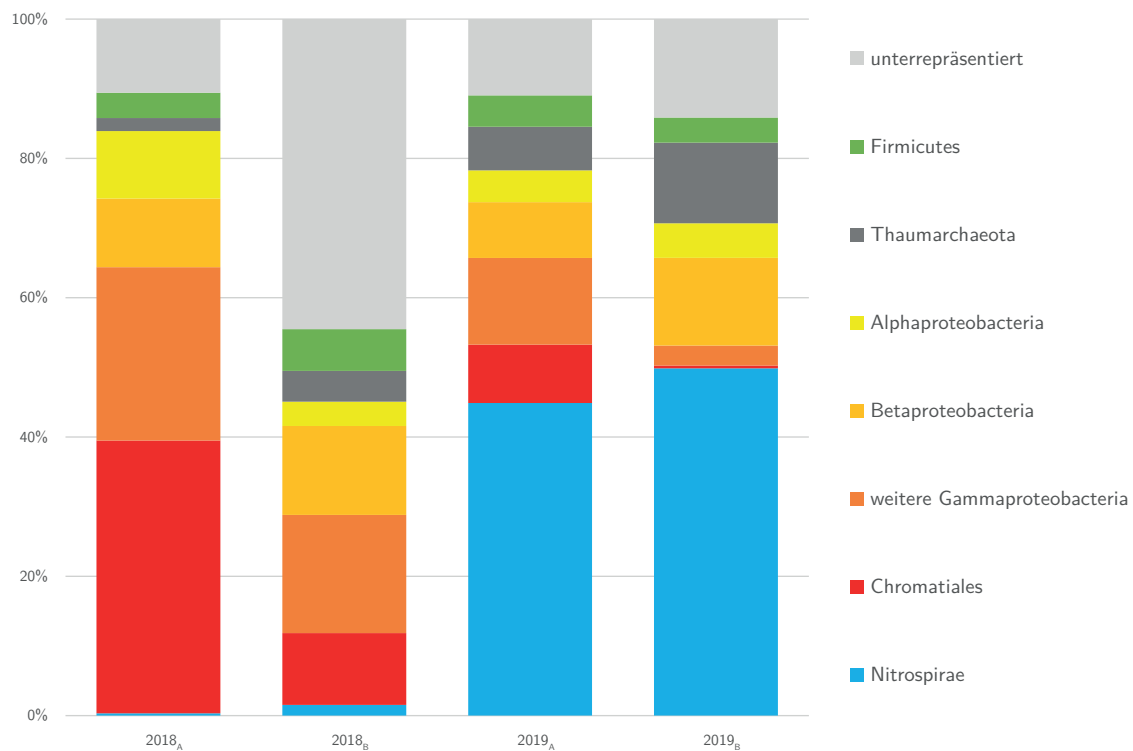


ABBILDUNG 3.12: Graphische Darstellung der phylogenetischen Analyse des Metatranskriptoms. Die Balken repräsentieren den Anteil an Transkripten, welche einem Phylum zugeordnet werden konnten. Zur Übersicht wurden Organismengruppen zusammengefasst, wenn diese nicht näher zugeordnet werden konnten oder allein unterrepräsentiert sind.

Aus den Daten wird ersichtlich, dass in den beiden Jahren unterschiedliche phylogenetische Gruppen dominant waren. Während im Jahr 2018 die meisten Transkripte „*Cd. Tenderia* sp.“ zugeordnet werden konnten, traf dies 2019, mit etwa der Hälfte aller Transkripte, auf Vertreter der Nitrospirae zu. Hierbei handelt es sich zu über 99 % um Gene, für welche keine tiefere phylogenetische Annotation existiert. Zusätzlich ist insbesondere in den Proben aus 2019 eine hohe Genexpression der Thaumarchaeota auffällig, nachdem diese in genomischen Analysen vollständig unterrepräsentiert waren ( $je < 0,2\%$ , siehe Abb. 3.9).

Die Daten des Jahres 2019 scheinen sich dabei zunächst gegenseitig zu bestätigen und erzeugten ein gut reproduzierbaren Datensatz. Da die Mitglieder des, in dieser Anreicherung dominanten Stamms der Nitrospirae, als Nitrifizierer bekannt sind, wurde nach Genen für Nitritoxidasen gesucht. Insgesamt wurden zehn Nitrit oxidoreduktasen entdeckt, welche jedoch zusammengerechnet einen Expressionwert von 5 TPM zeigen. Die höchstexprimierten Gene in diesem Phylum stellen hingegen Elektrontransferproteine dar. Etwa 10 % aller Transkripte innerhalb des Phylums können drei Monohäm-Cytochromen zugeordnet werden, 5 % zu Ferredoxinoxidoreduktasen und 3 % zu Plastocyaninen. Ein hochexprimiertes Gen für ein Schlüsselenzym der Nitrifikation die Ammoniummonooxygenase wurde hingegen im

ebenfalls auffälligen Stamm der Thaumarchaeen gefunden, welcher metabolisch äußerst aktiv ist, im Genom jedoch unterrepräsentiert sind. Die zwei höchstexprimierten Gene der Thaumarchaeen in diesem Konsortium kodieren für S-Layer-Proteine und machen 75 % der Transkripte in diesem Phylum aus. Darauf folgt eine Ammoniummonooxygenase mit ca. 7 %, Sieben Gene für Eisen-Schwefel Proteine mit ca. 3 % und vier Kupfer-bindende Proteine mit insgesamt ca. 1 % aller Transkripte im Phylum.

Im Vergleich der Proben von 2018 fallen große Unterschiede in der Verteilung dominanter Gruppen auf. Das Verhältnis von Chromatiales zu anderen Gammaproteobakterien, sowie das Verhältnis aller Gammaproteobakterien zu anderen Gruppen, bleibt zwar im Wesentlichen konstant, jedoch ist der Anteil unterrepräsentierter Gruppen mit über 40 % deutlich höher in der Probe 2018<sub>B</sub>. Hierbei handelt es sich zum Teil um unterrepräsentierte Gruppen wie Bacteroidetes, Actinobacteria, Delta- und Epsilonproteobakterien, welche insgesamt ca. 6 % ausmachen. Mit 18 % finden sich jedoch vor allem Gene mit Homologen aus unkultivierten Bakterien, welche noch keine phylogenetische Einteilung besitzen.

### **Transkription in *Cd. Tenderia***

Aufgrund der hohen genomischen Abundanz und Genexpression von „*Cd. Tenderia* sp.“, wurden die Transkriptomwerte für diesen Organismus separat betrachtet. Durch den Vergleich der Werte zwischen den einzelnen Proben, konnten Gene identifiziert werden, welche in jeder Probe zu den höchst exprimierten gehören.

Gene, welche in mindestens drei der Proben exprimiert sind, wurden mit der KEGG-Datenbank abgeglichen und im entsprechenden Stoffwechselweg von "*Ca. Tenderia electrophaga*" rot eingefärbt. Ein Modell des zentralen Kohlenstoffmetabolismus ist in Abb. 3.13 dargestellt. Zu erkennen sind in dem Modell eine Transkription eines nahezu vollständigen Kohlenstoffmetabolismus, welcher unter anderem die RuBisCO für eine CO<sub>2</sub>-Fixierung durch den Calvinzyklus nutzt, eine aktive Gluconeogenese und einen fast geschlossenen Citratzyklus aufweist. Lücken in den Stoffwechselwegen basieren zum Teil auf fehlenden Annotationen im Genom von "*Ca. Tenderia electrophaga*" (schwarze Pfeile) oder auf fehlende Transkripte in der Anreicherung, welche den entsprechenden Genen zugeordnet werden konnten (grüne Pfeile).

Zudem finden sich auffällig hohe Werte für Gene des Schwefelmetabolismus. Ein entsprechendes Modell ist in Abb. 3.14 dargestellt. Es finden sich mehrere Gene, welche verschiedenen Wegen der assimilatorischen Schwefelreduktion von Sulfat bis Sulfid dienen. Zugleich können Teile dieses Wegs jedoch auch für eine dissimilatorische Schwefeloxidation genutzt werden. Es werden auch Gene exprimiert, welche ausschließlich im Kontext einer dissimilatorischen Schwefeloxidation bekannt sind. Eine Auswahl von Genen, welche für einen potenziellen Elektrontransportweg in Frage kommen, sind in Tabelle 3.2 aufgelistet.

TABELLE 3.2: Hochexprimierte Gene in „*Cd. Tenderia* sp.“ welche potenziell in einen Elektrontransportweg involviert sind. TPM-Werte stellen den Mittelwert aus allen vier Proben der kathodischen Konsortien dar und sind auf die Summe der „*Cd. Tenderia* sp.“ Gene normalisiert. Die annotierte Funktion entspricht der des nächsten identifizierten Homologs. Das Homolog DFR30\_1178 stammt aus *Thiogranum longum*. Identifikatoren, welche mit Tel\_ beginnen, stammen aus "*Ca. Tenderia electrophaga*"

Homolog	annotierte Funktion	TPM
<b>CO<sub>2</sub>Fixierung</b>		
Tel_01105	RuBisCO large chain	1019
Tel_03300	RuBisCO small chain	1072
<b>Schwefelmetabolismus</b>		
DFR30_1178	Rhodanese-related sulfurtransferase	8979
Tel_05390	Sulfite reductase	1570
Tel_11070	Cysteine desulfurase	1381
Tel_01710	Pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	1442
Tel_05865	PAPS sulfotransferase	652
Tel_16370	S-disulfanyl-L-cysteine oxidoreductase SoxD	165
<b>c-Typ Cytochrome</b>		
Tel_16515	Multiheme cytc	1295
Tel_16520	Multiheme cytc	1616
Tel_05190	Cytochrome <i>c-551</i>	5498
Tel_14260	Cytochrome <i>c-551</i>	28167
Tel_07445	Cytochrome <i>c</i>	5565

Entsprechend der Beschreibung von „*Cd. Tenderia electrophaga*“ finden sich auch in dieser Anreicherung auf den 10 *contigs* einige Gene für c-Typ Cytochrome, welche zum Teil ebenfalls auffällig hohe Expressionswerte zeigen. Unter den höchstexprimierten befinden sich dabei drei Monohäme, von denen zwei als Cytochrom *c551* annotiert sind und zwei als Trihäme. Homologe Domänen dieser Trihäme sind darüberhinaus in elektronentransferierenden *nanowire* aus *G. sulfurreduces* bekannt. Diese Cytochrome wurden ebenfalls Tabelle 3.2 angefügt.

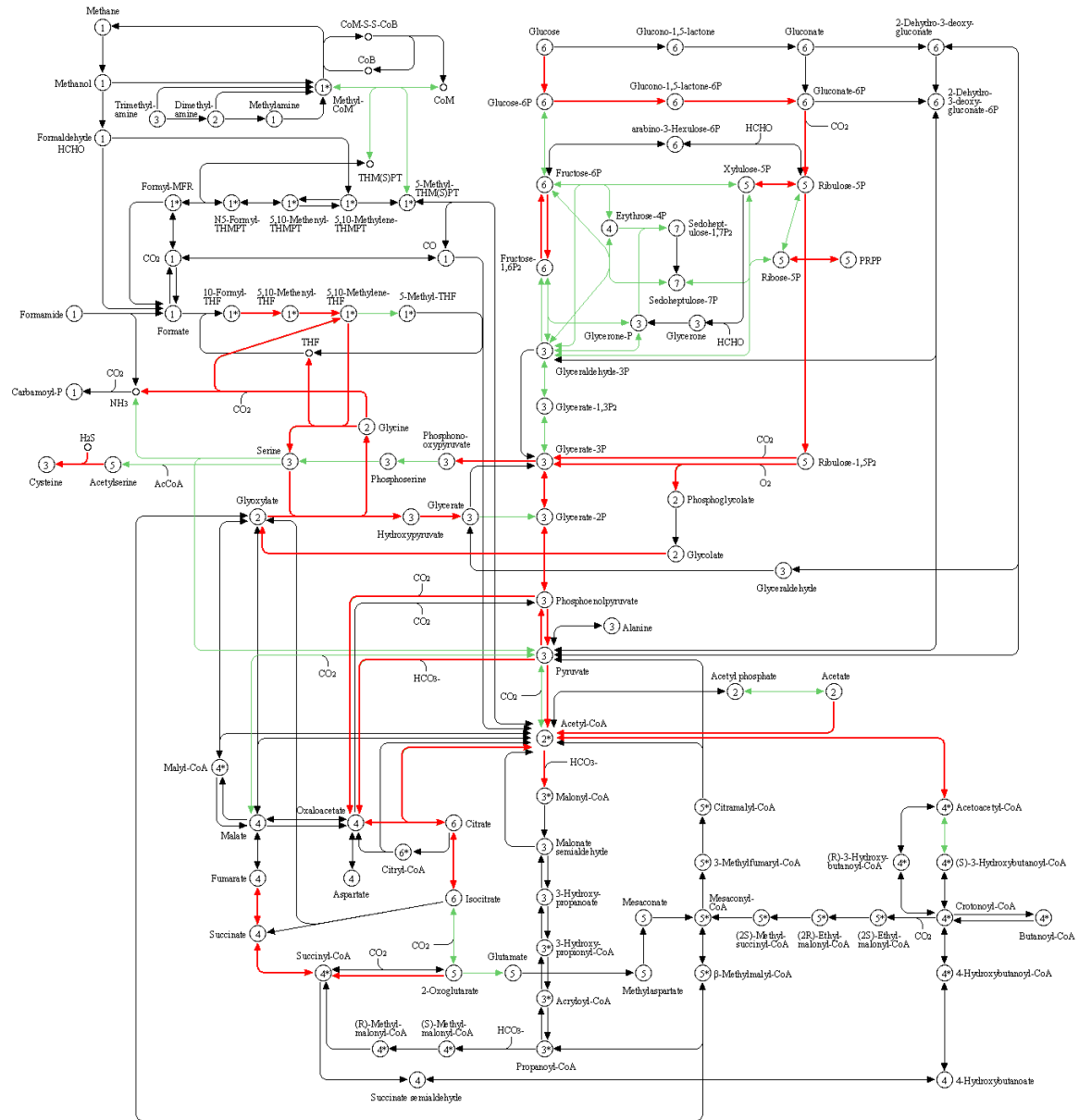


ABBILDUNG 3.13: Schematische Darstellung der Stoffwechselwege im zentralen Kohlenstoffmetabolismus von *Cd. Tenderia*. Hochexprimierter Gene, welche „*Cd. Tenderia electrophaga*“-Bakterium zugeordnet werden konnten, sind in rot eingefärbt. Weitere Gene, welche im Genom vorkommen jedoch nicht besonders hoch exprimiert sind, sind in grün eingefärbt.

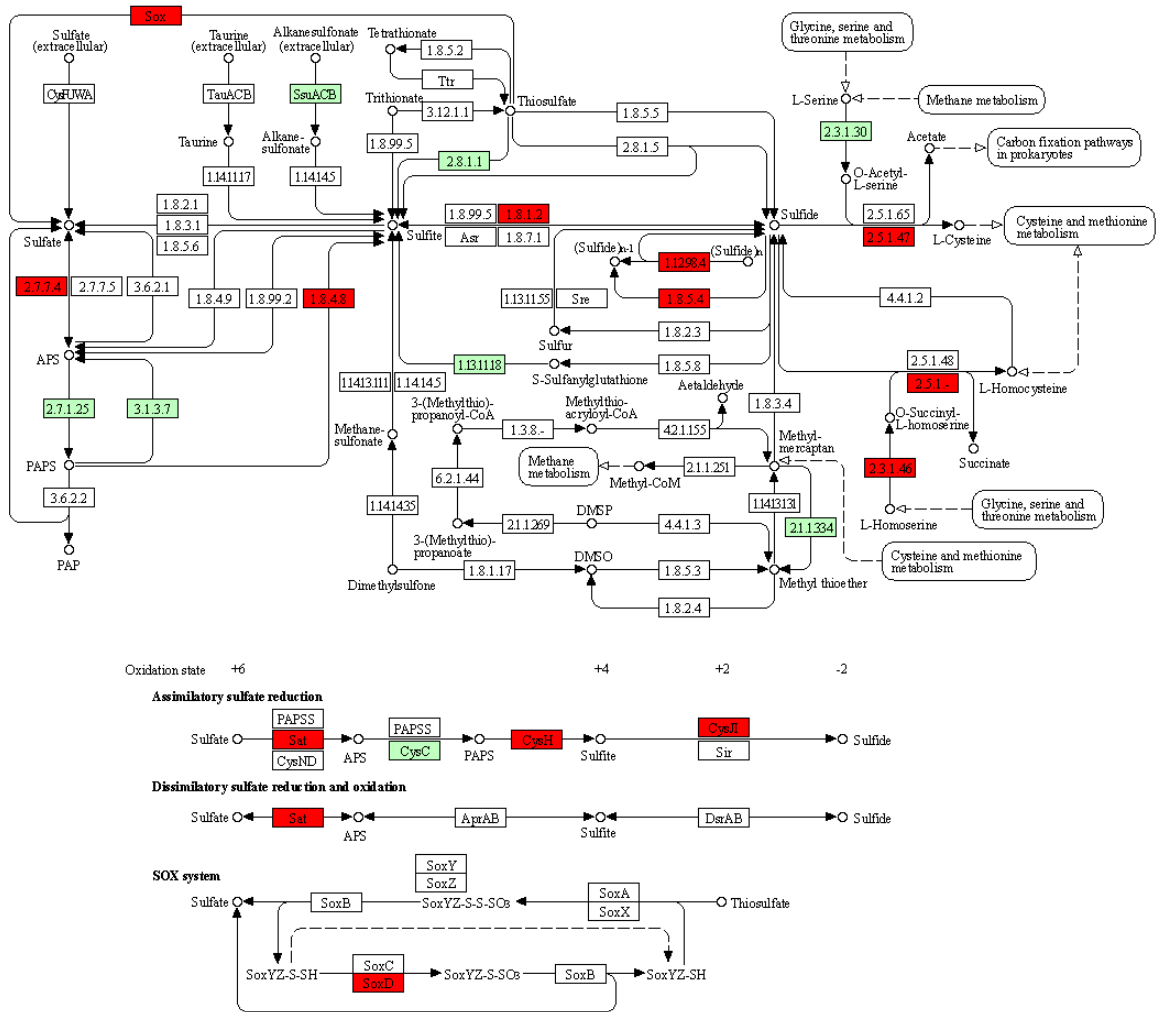


ABBILDUNG 3.14: Schematische Darstellung der Stoffwechselwege im Schwefelmetabolismus von *Cd. Tenderia*. Hochexpressierte Gene, welche einem Chromatiales-Bakterium zugeordnet werden konnten, sind in rot eingefärbt. Weitere Gene, welche im Genom vorkommen jedoch nicht besonders hoch exprimiert sind, sind in grün eingefärbt.

### 3.3 Elektroautotrophie in *S. acidocaldarius*

Neben einem wasserstoffabhängigen Elektronentransport existieren vereinzelt auch Hinweise auf einen Transport, der durch Enzyme der Schwefeloxidation katalysiert wird. So wurden zwei nicht-hydrogenotrophe Schwefeloxidierer (*A. thiooxidans*, *T. denitrificans*) an Kathoden beschrieben und eine Aktivität von Heterodisulfidreduktase-Komplexen auf Kathoden postuliert (Jung *et al.*, 2021; Deutzmann *et al.*, 2015; Lienemann *et al.*, 2018). Für eine Charakterisierung wurde daher ein Schwefeloxidierer gesucht. Schließlich wurde in einer thermoacidophilen Anreicherung eine hohe Abundanz von Sulfolobaceae gezeigt, welche als einzige Familie in diesem Konsortium keine hydrogenotrophen Vertreter beinhaltet. Innerhalb der Sulfolobaceae ist *S. acidocaldarius* der namensgebende Typstamm, welcher gut untersucht, genetisch zugänglich und von großem biotechnologischen Interesse ist (Quehenberger *et al.*, 2017). Als potenzieller Kandidat für eine elektroautotrophe Anwendung sollte dieser Organismus daher auf ein kathodisches Wachstum untersucht werden.

#### 3.3.1 Kathodisches Wachstum von *S. acidocaldarius*

Für den Nachweis eines kathodischen Wachstums von *S. acidocaldarius*, wurde eine Kultivierung in einer bedruckbaren Fließzellperipherie gewählt. Diese ermöglicht eine Kultivierung bei hohen Temperaturen und in sauren Medien. Zugleich ist eine kontinuierliche Beobachtung des kathodischen Biofilms durch OCT-Aufnahmen möglich. Durch das bedruckbare System, und den kontinuierlichen Mediumfluss über den Biofilm ist eine erhöhte Nährstoffversorgung der Zellen von schlecht löslichen, gasförmigen Substraten möglich. Da insbesondere CO<sub>2</sub> und Sauerstoff bei hohen Temperaturen und niedrigen pH-Werten eine geringere Löslichkeit aufweisen, konnte in diesem System die Gefahr einer potenziellen Limitierung dieser Faktoren vermieden werden. Um den Einfluss der Substratversorgung zu evaluieren, wurden daher Unterschiede in der Fließgeschwindigkeit innerhalb der Zelle genutzt. Hierfür wurden an drei Stellen entlang der Kathode Aufnahmen des Biofilms angefertigt. Abb. 3.15 zeigt die Fließgeschwindigkeit über der Kathode und den Stellen an denen Aufnahmen angefertigt wurden.

Um eine elektrotrophe Kultivierung zu ermöglichen, mussten zunächst passende Parameter bestimmt werden, da insbesondere zu hohe Sauerstoffkonzentrationen und zu geringe Arbeitspotenziale zu hohen, elektrischen Strömen führten, und somit eine abiotische Gasentwicklung an den Elektroden förderte. Um dies zu vermeiden wurde schließlich die Sauerstoffkonzentration im Gasgemisch auf 0,5 % und das Potenzial auf -350 mV (vs. SHE) gesetzt. Höhere Sauerstoffkonzentrationen führten zu einem instabilen System, von dem keine reproduzierbaren Daten aufgenommen werden konnten.

Eine Kultivierung mit geringerem Potenzial war in begrenztem Umfang möglich. Zum Vergleich wurde daher ebenfalls das Wachstum bei einem Potenzial von -500 mV (vs. SHE) untersucht.

Über einen Zeitraum von 14 Tagen wurden Aufnahmen an den einzelnen Stellen auf einer Kathode gemacht. Für die Auswertung der Daten wurden zunächst Höhenprofile erstellt, welche vergleichend für eine Kultivierung bei -350 mV (vs. SHE) und bei einem offenen Stromfluss (OCP - *open circuit potential*) zwischen den Elektroden in Abb. 3.15 dargestellt sind. Die Aufnahmen stellen zur besseren Kenntlichmachung vergrößerte Ausschnitte der eigentlichen Aufnahmen dar. Sämtliche Versuche wurden im Duplikat angefertigt.

Wie in Abbildung 3.15 zu erkennen ist, befinden sich bei -350 mV (vs. SHE) zum Beginn des Versuchs kaum Zellen auf der Kathode. Im Kontrollversuch hingegen korreliert die Biofilmhöhe mit sinkender Fließgeschwindigkeit und insbesondere an Stelle C ist ein deutlicher Biofilm zu sehen. Im Verlauf von 14 Tagen schwindet der Biofilm an dieser Stelle jedoch. Eine ähnliche Entwicklung, in schwächerem Umfang ist an Stelle B der OCP-Kontrolle erkennbar. An Stelle A sind über den gesamten Zeitraum kaum Zellen zu erkennen. Bei einem angelegten Potenzial von -350 mV (vs. SHE) ist jedoch eine Zunahme des Biofilms an allen drei Stellen erkennbar. Die Biofilmmzunahme erscheint dabei zunächst sehr gleichmäßig und in kolonienartigen Strukturen auszuwachsen. An Stelle C ist etwas früher ein signifikanter Aufwuchs erkennbar.

Um eine Quantifizierung des Biofilms im Zeitverlauf darzustellen, wurde das Biovolumen über 14 Tage hinweg basierend auf den Höhenprofilen bestimmt. Zum zusätzlichen Vergleich wurde im Triplikate auch das Biovolumen bei einer Kultivierung mit -500 mV (vs. SHE) aufgenommen. Da sich jedoch keine reproduzierbare Entwicklung des Biofilms zeigte, sind diese Daten isoliert dargestellt. Die Entwicklung des durchschnittlichen Biovolumens auf der Kathode unter den drei genannten Bedingungen und an verschiedenen Stellen sind im Anhang in Abb. A.3 dargestellt.

Um eine bessere Darstellung der Biovolumenänderung zu erreichen, wurde das Biovolumen in allen Versuchen auf den jeweiligen Startwert normalisiert. Da sich das initiale Biovolumen zwischen den einzelnen Ansätzen zum Teil stark unterschied, konnte somit ein besserer Vergleich des Zellwachstums erreicht werden. Die entsprechenden Daten sind in Abbildung 3.16 dargestellt.

Zuletzt sollte eine Aussage über die Biofilmmorphologie getroffen werden. Als probates Mittel dient dafür die Oberflächen-Rauheit. Diese stellt die durchschnittliche Standardabweichung der Biofilmhöhe, in Relation zur Biofilmhöhe dar. Ein höherer Wert spiegelt also eine unebenere Oberfläche des Biofilms dar. Die Oberflächenrauheit wurde für das Biofilmmwachstum bei -350 mV (vs. SHE) bestimmt und ist im Verlauf von 14 Tagen in Abbildung 3.15 dargestellt.



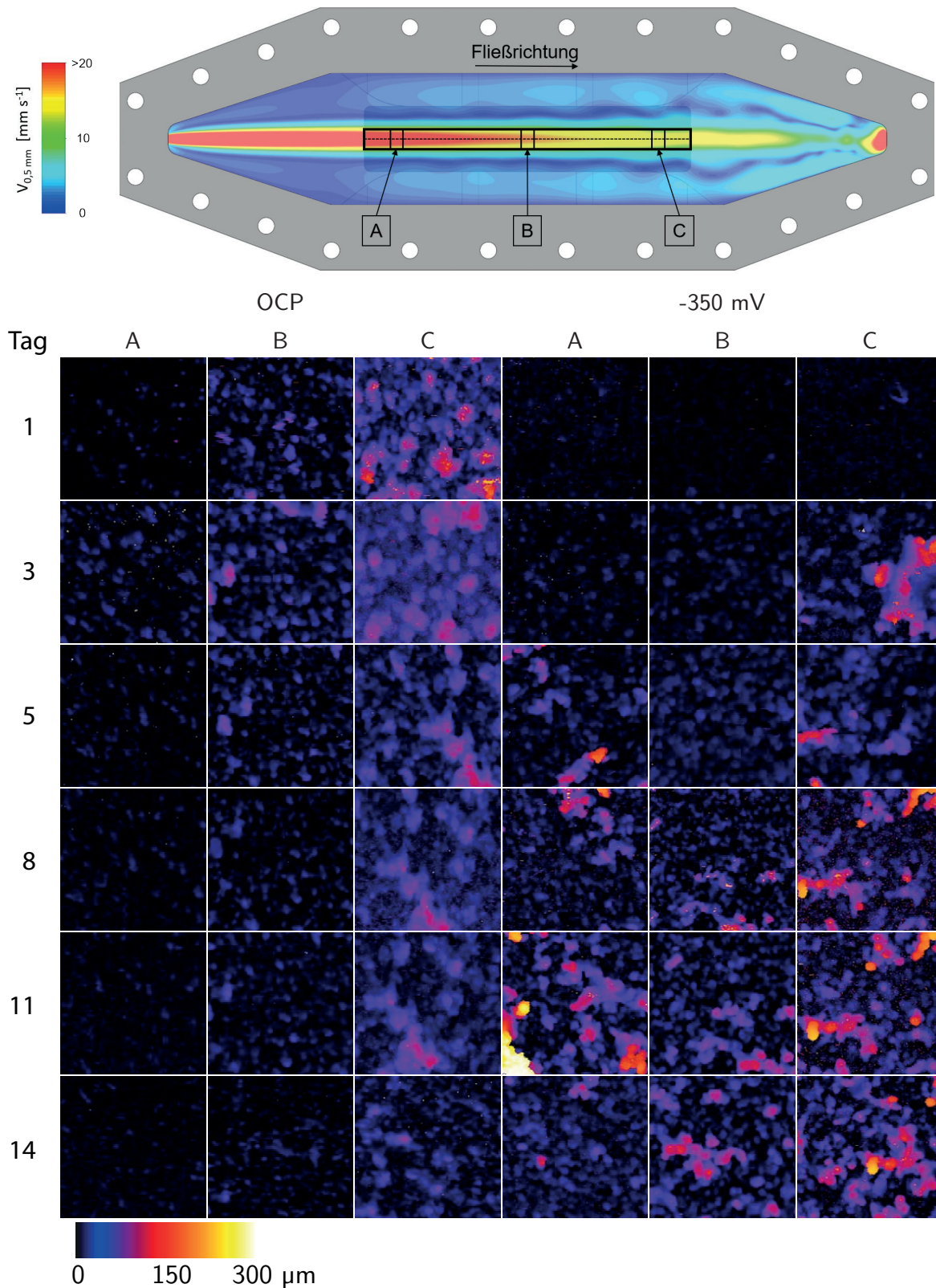


ABBILDUNG 3.15: Strömungssimulation der verwendeten Fließzelle mit Kennzeichnung der OCT-Messtellen (oben) und Höhenprofil des kathodischen *S. acidocaldarius* Biofilms. Gezeigt sind die Höhenprofile bei einem angelegten Potenzial von  $-350 \text{ mV}$  (vs. SHE, rechts) im Vergleich zu einem Versuch ohne angelegte Spannung (OCP, links) an drei Stellen (A, B und C). Die Farben in der Fließzelle repräsentieren die Strömungsgeschwindigkeit des Mediums bei einem Volumenstrom von  $100 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $0,5 \text{ mm}$  oberhalb der Kathodenoberfläche. Aus Hackbarth *et al.*, 2020

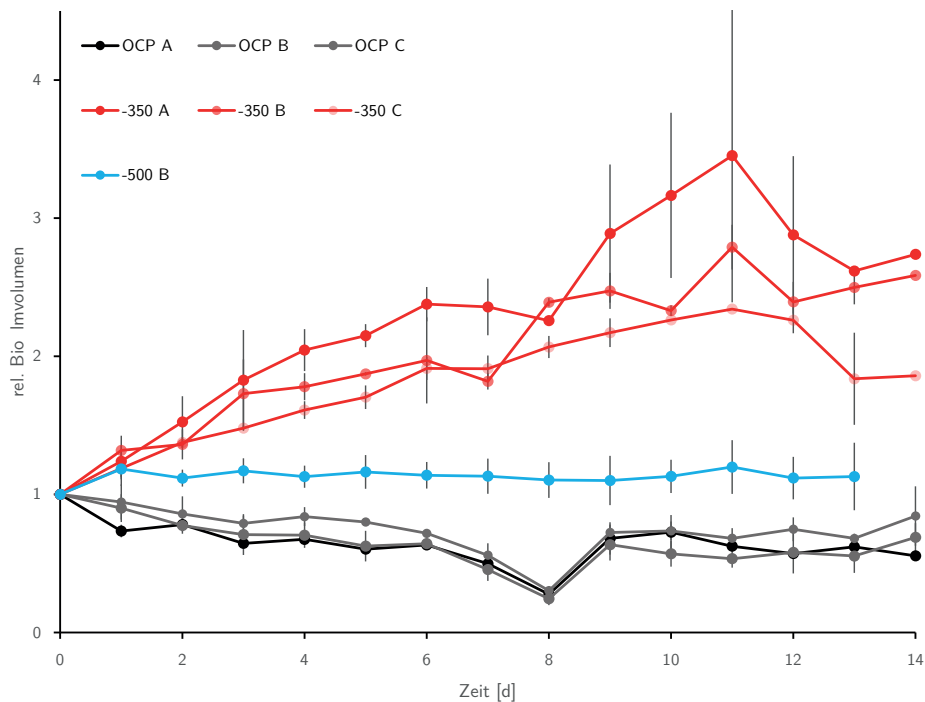


ABBILDUNG 3.16: Zeitliche Biovolumenänderung des kathodischen Biofilms von *S. acidocaldarius* bei unterschiedlichen Potenzialen. Das Biofilmvolumen wurde auf den  $t_0$ -Wert normalisiert. Gezeigt sind Werte für ein Wachstum in der Mitte der Fließzelle bei -500 mV und an drei Stellen (s. Abb. 3.15) bei -350 mV (je vs. SHE) und bei einem OCP-Versuch.

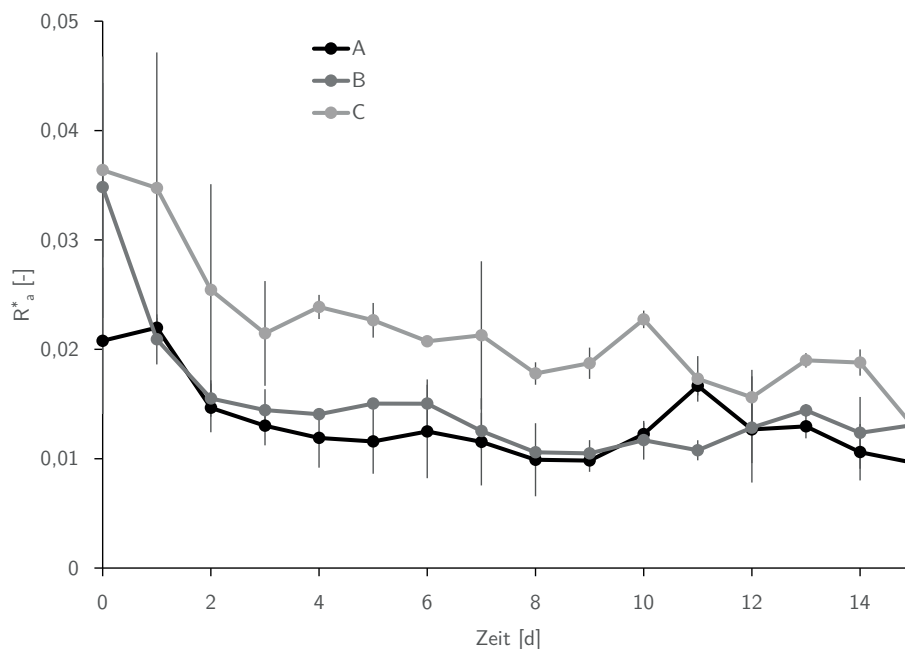


ABBILDUNG 3.17: Verlauf des Oberflächen-Rauheitskoeffizient  $R_a^*$  des *S. acidocaldarius*-Biofilms an drei Stellen der Fließzelle (A,B und C, s. Abb. 3.15).

### 3.3.2 Vergleichende Transkriptomanalyse in *S. acidocaldarius*

Nachdem ein kathodisches Biofilmwachstum nachgewiesen werden konnte, sollte zum tieferen Verständnis der zellulären Prozesse eines kathodischen *S. acidocaldarius*-Biofilms eine vergleichende Genexpressionsanalyse unter heterotrophen und elektroautotrophen Wachstumsbedingungen durchgeführt werden. Dabei sollte zum Einen die Expression von Genen des zentralen Kohlenstoffmetabolismus, insbesondere von Genen zur CO<sub>2</sub>-Fixierung, untersucht werden. Zum anderen sollten die Transkriptomdatensätze auf mögliche EET-Mechanismen zur Elektronenaufnahme an der Kathode hin untersucht werden.

Die heterotrophe Kultivierung erfolgte unter Schütteln mit NZ-Aminen und Dextrin als Elektronen- und Kohlenstoffquelle in einem Erlenmeyerkolben bei 60 °C. Die elektroautotrophe Kultivierung erfolgte in einem Elektrosynthesereaktor wie in Abschnitt 3.14 beschrieben bei 60 °C mit einem Gasgemisch aus CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> (99,5 %/0,5 %; v/v) als Kohlenstoffquelle bzw. Elektronenakzeptor. Die Kathode diente als einzige Energie- und Elektronenquelle im System. Eine mikroskopische Aufnahme einer Kultur, welche zur Sequenzierung genutzt wurde, ist auf einem Graphitfilament mit Nilrot angefärbt in Abb. 3.18 dargestellt. Proben wurden von Duplikaten beider Kultivierungsbedingungen genommen und RNA isoliert. Das Transkriptionsmuster der Proben wurde mittels einer Illuminasequenzierung bestimmt. Die Anzahl sequenzierter *reads*, sowie der Anteil, welcher dem Referenzgenom (CP000077) zugeordnet werden konnten, sind in Tab. 3.3 aufgelistet.

TABELLE 3.3: Anzahl an *reads* aus der Illuminasequenzierung für je zwei heterotroph und elektrotroph gewachsene *S. acidocaldarius* Kulturen, sowie die Anzahl an *reads*, welche auf das Referenzgenom *gemapped* werden konnten.

<b>Probe</b>	<b><i>reads</i></b>	<b><i>gemapped</i></b>
Elektrotroph E1	22 Mio	15 Mio
Elektrotroph E2	29 Mio	19 Mio
Heterotroph H1	44 Mio	31 Mio
Heterotroph H2	37 Mio	26 Mio

Eine statistische Hauptkomponentenanalyse der Transkriptome in Abb. 3.19 legt distinkte Expressionsprofile unter den verschiedenen Wachstumsbedingungen nahe. Dabei unterscheidet sich das Expressionsprofil zwischen den beiden heterotrophen Kulturen beinahe ebenso wie jeweils zu den beiden elektrotrophen Expressionsprofilen, welche zueinander eine geringere Varianz aufweisen.

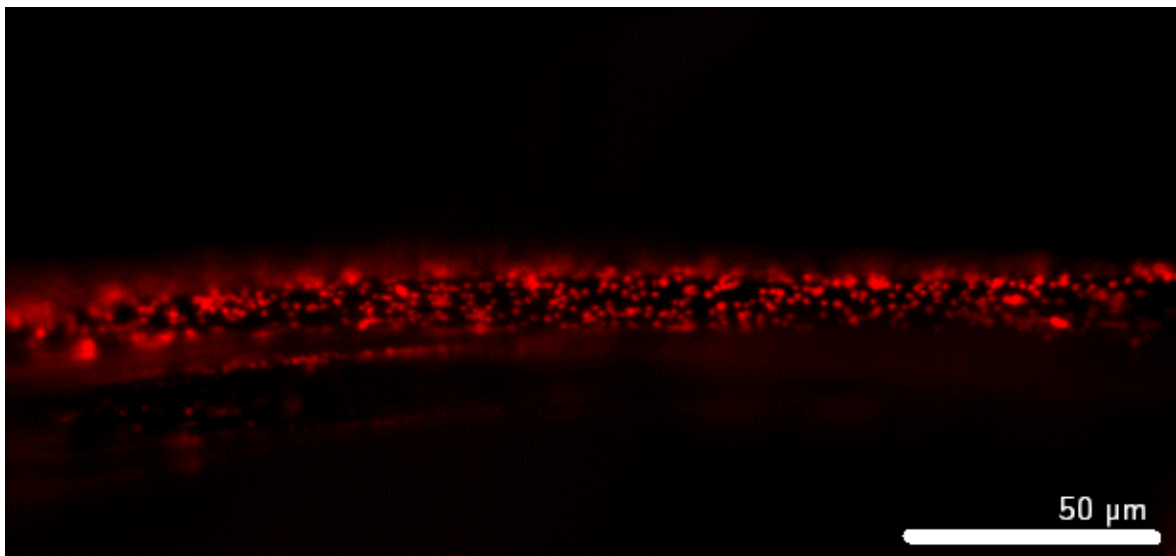


ABBILDUNG 3.18: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *S. acidocaldarius* auf einem Kathodenvlies, nach 14-tägiger Kultivierung bei einem kathodischen Potenzial von -350 mV (vs. SHE).

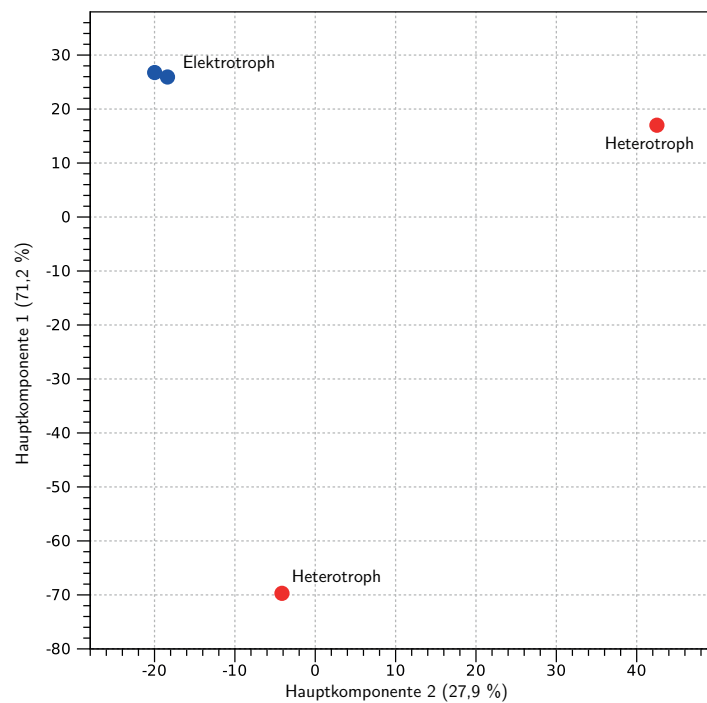


ABBILDUNG 3.19: Hauptkomponentenanalyse der vergleichenden Transkriptomdatensätze aus *S. acidocaldarius*.

### **Kohlenstoffmetabolismus in *S. acidocaldarius***

Um ein elektroautotrophes Wachstum auf Ebene der Genexpression zu bestätigen, wurden zunächst die Expressionsmuster der Gene des 3-HP/4-HB-Zyklus miteinander verglichen, welchen *S. acidocaldarius* für die CO<sub>2</sub>-Fixierung nutzt. Eine schematische Darstellung des Zyklus und der Änderung in der Genexpression sind in Abb. 3.20 dargestellt.

Während die meisten Gene in diesem Zyklus unter kathodischem Wachstum hochreguliert sind und somit eine aktive CO<sub>2</sub>-Fixierung implizieren, scheint das Schlüsselenzym in diesem Zyklus heterotroph hochreguliert zu sein. Die Propionyl-CoA Carboxylase katalysiert dabei zwei Schritte im Zyklus – die Carboxylierung von Propionyl-CoA und von Acetyl-CoA. Als alternatives, substituierendes Gen wurde eine Acetoacetat De-/Carboxylase identifiziert, welche unter elektroautotrophen Bedingungen hochreguliert ist. Die Veränderung in der Expression des zugehörigen Gens (Saci\_1155) ist daher ebenfalls in Abb. 3.20 dargestellt.

Um den zentralen Kohlenstoffmetabolismus unter elektrotrophen Bedingungen besser zu verstehen, wurden ebenfalls Gene des Citratzyklus und assoziierte Stoffwechselwege betrachtet. Eine schematische Darstellung des Zyklus und der Änderung in der Genexpression sind in Abb. 3.21 dargestellt.

Die meisten Gene des Citratzyklus sind während des heterotrophen Wachstums deutlich hochreguliert. Dies entspricht der Erwartung, da ein Abbau organischer Kohlenstoffe zu CO<sub>2</sub> zunächst dem 3-HP/4-HB-Zyklus entgegenwirkt. Vereinzelt sind jedoch Gene in Citratzyklus-assoziierten Stoffwechsewegen hochreguliert, welche eine Gluconeogenese ausgehend von Produkten der CO<sub>2</sub>-Fixierung wie Acetyl-CoA und Propionyl-CoA ermöglichen.

Durch Unterschiede im Kohlenstoffmetabolismus konnte ein Wechsel der dissimilatorischen Kohlenstoffverwertung unter heterotrophen Wachstumsbedingungen zu einer assimilatorischen Kohlenstoffaufnahme unter elektrotrophen Bedingungen gezeigt werden. Im Folgenden wurden daher Gene gesucht, welche in einem potenziellen EET-Mechanismus zur Energiekonservierung genutzt werden können.

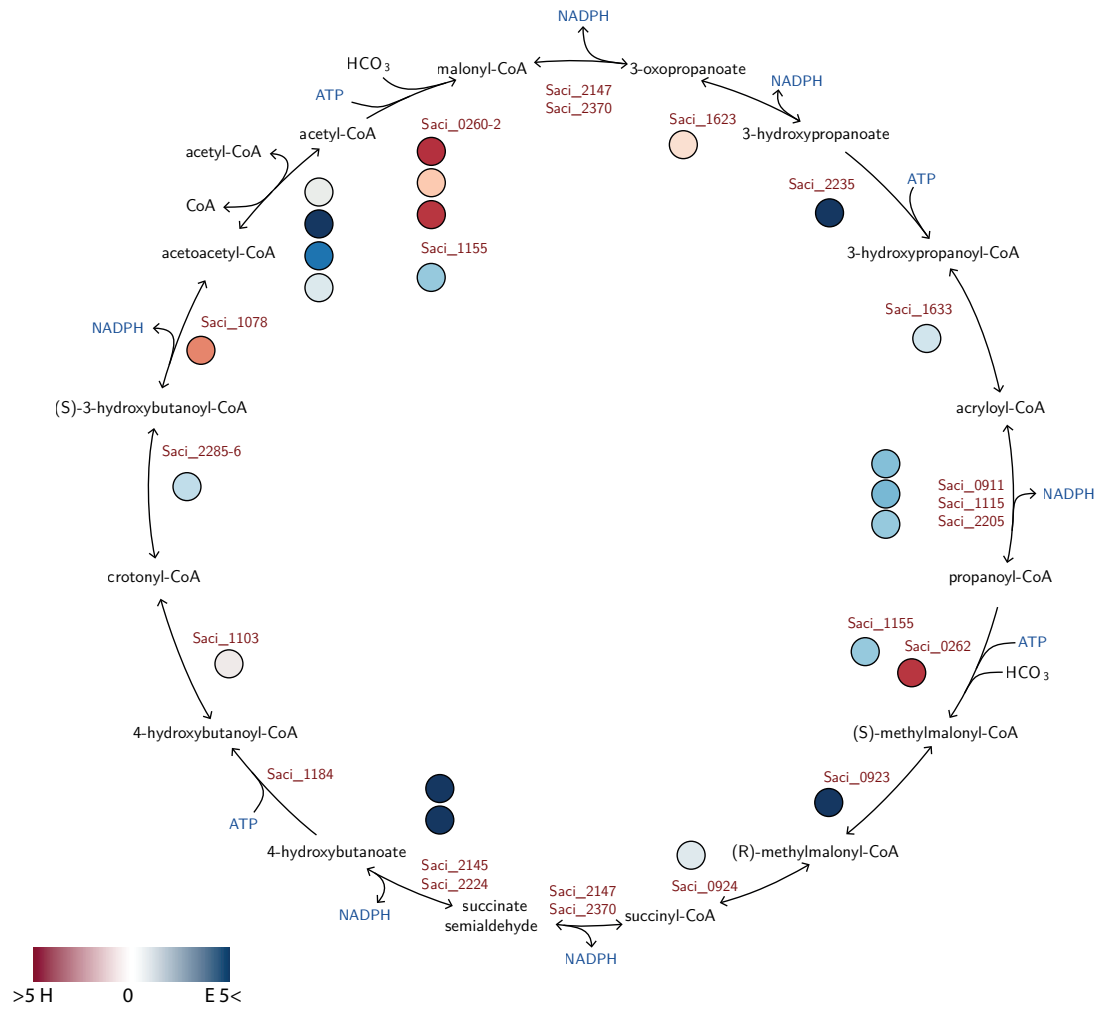


ABBILDUNG 3.20: Schematische Darstellung des 3-HP/4-HB-Zyklus in *S. acidocaldarius* mit Genannotation. Unterschiede in der Transkription sind durch farbliche Kreise dargestellt.

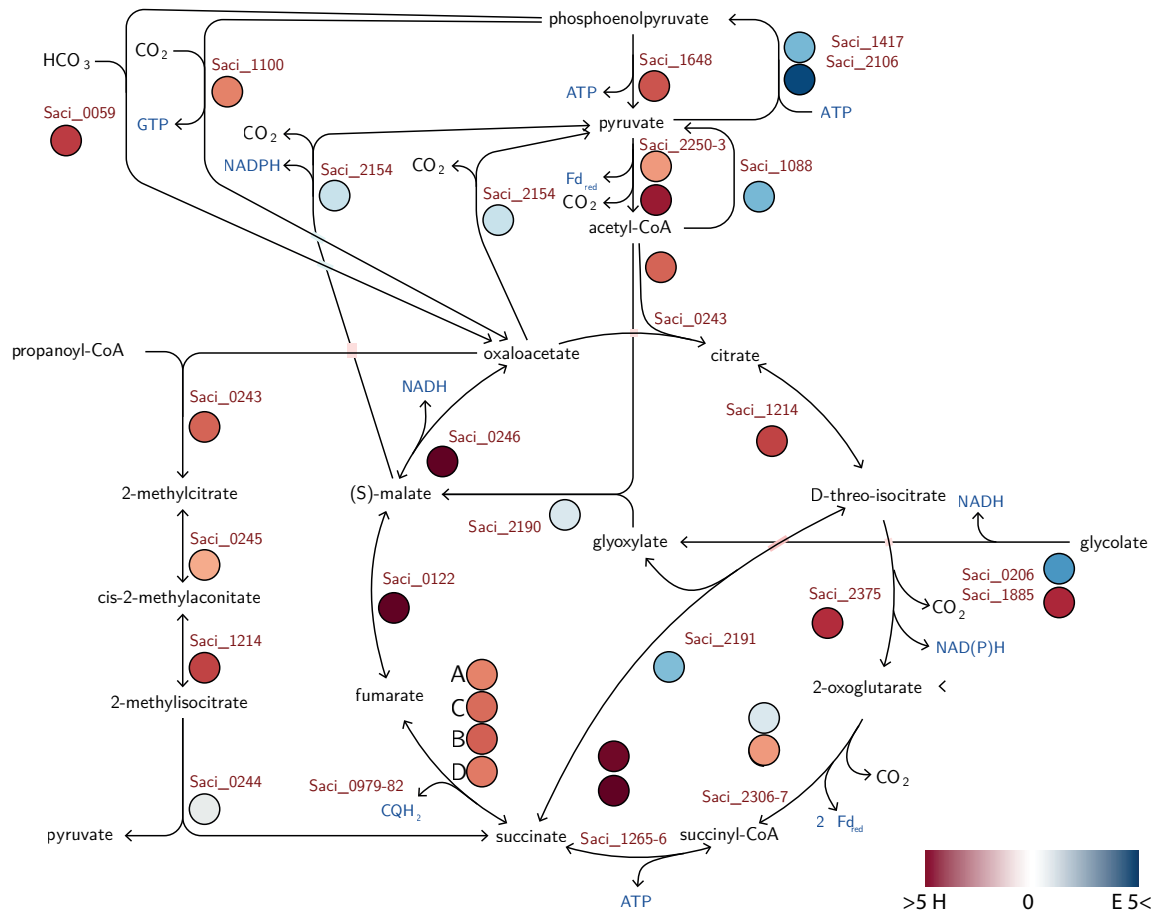


ABBILDUNG 3.21: Schematische Darstellung des zentralen Kohlenstoffmetabolismus in *S. acidocaldarius* mit Genannotation. Unterschiede in der Transkription sind durch farbliche Kreise dargestellt.

### Energiekonservierung und EET in *S. acidocaldarius*

Für eine Atmungskette unter heterotrophem Wachstum ist *S. acidocaldarius* in der Lage, Elektronen über eine NADH-Dehydrogenase oder einer Succinatdehydrogenase in den Chinonpool einzuspeisen (*sdh*- und *nuo*-Gencluster). Mechanismen für eine Elektronenaufnahme von einem anorganischen Elektronendonator sind bisher hingegen nicht beschrieben. Vom Chinonpool, transferiert ein Cytochrom *bc1* Komplex aus SoxNL-CbsAB-OdsN die Elektronen weiter auf eine terminale Oxidase. In *S. acidocaldarius* sind dafür drei distinkte terminale Oxidasen beschrieben: SoxABCDL, SoxEFGHIM und DoxBCE. Das *soxABDL*-Cluster wurde heterotroph besonders hoch exprimiert, ebenso wie das ATP-Synthase Cluster *atpABCDEFHI*. Während der elektroautotrophen Kultivierung wurde der Komplex SoxEFGHIM, ebenso wie der Elektronentransferierende Komplex SoxNL-CbsAB-OdsN besonders hoch exprimiert. Das *doxBCE*-cluster wurde ebenfalls, in einem geringeren Ausmaß positiv reguliert. Eine Darstellung dieser Enzyme sind in Abbildung 3.22 zu finden.

Da hiermit jedoch noch nicht der Elektronentransport in den Chinonpool geklärt ist, wurden nun hoch exprimierte Gene unter elektrotrophem Wachstum gesucht. Besonders auffällig sind dabei zwei Gencluster, welche jeweils allein ca. 4-5 % aller Transkripte ausmachen. Ein Cluster aus zwei Genen (*Saci\_1271* und 2) kodiert für in Sulfolobus konservierte Proteine, welchen bisher keine Funktion zugeordnet werden konnte. Jedoch besitzt *Saci\_1271* eine helikale Transmembrandomäne. Das zweite Gencluster besteht aus 15 Genen, von denen die meisten keine Annotation besitzen. Durch Sequenzhomologien konnte jedoch zum Teil eine wahrscheinliche Funktion identifiziert werden. Die ersten fünf Gene repräsentieren Untereinheiten einer Heterodisulfidreduktase, für welche homologe Enzyme bereits an Kathoden beschrieben sind (Jung *et al.*, 2021; Deutzmann *et al.*, 2015; Lienemann *et al.*, 2018). Zusätzlich sind mit einer weiteren HdrC-Untereinheit, einer Sulfurtransferase (TusA), einer Disulfidreduktase (DsrE) und Glutaredoxin insgesamt sechs weitere Proteine welche für einen Transport reduzierter Schwefelgruppen bekannt sind, hochexprimiert. Schließlich finden sich noch zwei Pyridin Nukleotid-disulfid Oxidoreduktase ähnliche Gene (oder Sulfid-Chinon-Reduktasen – SQR) welche Elektronen aus Sulfidverbindungen in den Chinonpool einspeisen können.

Die normalisierten TPM-Werte und Änderung in der Regulation dieser Gene sind in Tab 3.4 aufgelistet.



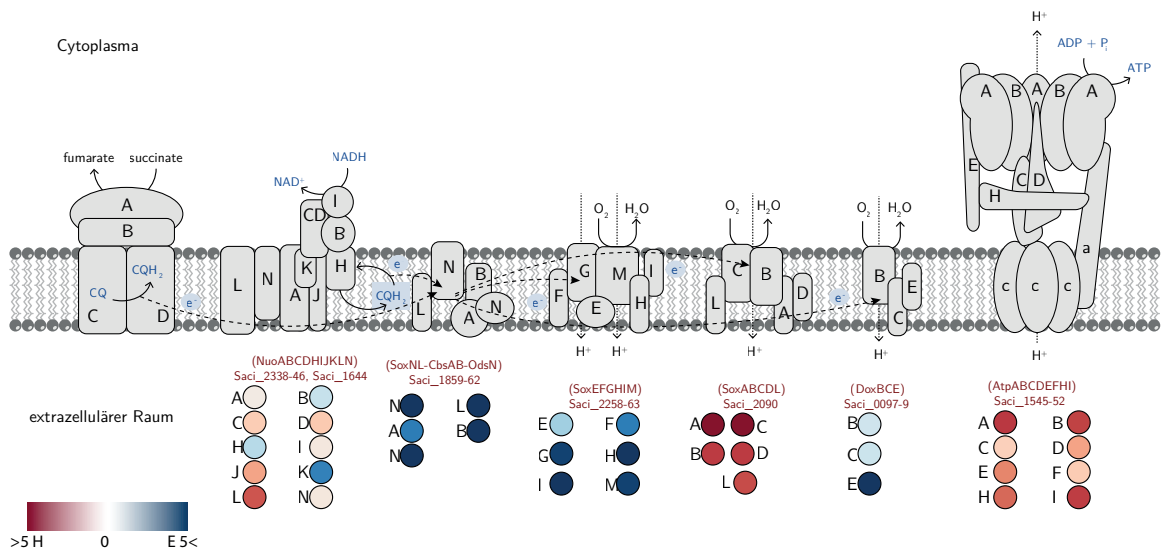


ABBILDUNG 3.22: Schematische Darstellung der Energiekonservierung in *S. acidocaldarius* mit Genannotation. Unterschiede in der Transkription sind durch farbliche Kreise dargestellt.

TABELLE 3.4: Transkription eines Schwefel-Metabolismus-Clusters aus *S. acidocaldarius*. TPM-Werte sind gemittelt für das elektrotrophe Duplikat angegeben. Die relative Änderung der Transkription gegenüber den heterotrophen Proben ist als *fold change* (FC) angegeben.

Genlokus	annotierte Funktion	TPM <sub>E</sub>	FC <sub>E vs H</sub>
325	Heterodisulfide reductase B2	639	1,3
326	4Fe-4S binding domain protein - hdrC2	825	1,3
327	Conserved protein	1014	3,1
328	Heterodisulfide reductase A1	1804	3,0
329	Conserved protein - hdrB1	5369	3,3
330	Conserved protein - TusA	7114	1,1
331	Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase - SQR	6046	1,4
332	Conserved Archaeal protein - DsrE	6027	1,3
333	Conserved protein	3891	1,4
334	Heterodisulfide reductase C1	1595	3,1
335	Conserved protein - TusA	9279	4,8
336	Conserved protein - SQR	6054	3,6
337	Conserved protein - DsrE	1680	2,3
338	Dihydrolipoamide dehydrogenase - SQR	423	5,3
339	Conserved protein	207	7,2
340	Conserved protein - glutaredoxin	325	5,2
1271	Conserved protein	15470	2,2
1272	Conserved protein	22960	2,6

## Kapitel 4

# Diskussion

Diese Arbeit widmete sich der Charakterisierung neuer Wege der mikrobiellen Elektrosynthese. Für die Nutzung des Treibhausgases CO<sub>2</sub> als Substrat lag der Schwerpunkt auf elektroautotrophes Wachstum, welches hier erstmals in einer nicht hydrogenotrophen Reinkultur gezeigt werden konnte. Dieser Stamm besitzt darüberhinaus ein großes Potenzial in der biotechnologischen Anwendung. Erkenntnisse zu einem neuartigen Elektronentransportmechanismus, konnten dabei in diesem Stamm entdeckt werden, und Elemente dessen in einem zweiten, unabhängigen Versuch einer Umweltanreicherung bestätigt werden. Gene welche aus dem Scheffelmetabolismus bekannt sind, schienen dabei eine entscheidende Rolle im EEA zu spielen und sollten weiter untersucht werden.

Zusätzlich, konnte in dieser Arbeit eine neue Methode entwickelt werden, mit der durch eine heterologe Expression auf Schlüsselemente im EET selektiert werden kann. Neue Genkombinationen, welche Spezies-spezifische physiologische Vorteile besitzen, können auf diese Weise identifiziert und auf Funktionalität getestet werden. So konnte ein neues Proteinsset identifiziert werden, welches einen verbesserten Elektronentransfer in *E. coli* ermöglicht.

### 4.1 Entwicklung synthetischer EET-Ketten

Ein Teil dieser Arbeit widmete sich der Entwicklung einer neuen Methode, um die Funktionalität heterolog exprimierter synthetischer extrazellulärer Elektronentransportketten zu testen. Da die EET-Kette aus dem metallreduzierenden Bakterium *S. oneidensis* sehr gut beschrieben ist, dienten Gene dieses Systems zunächst als Vorlage. Die entscheidenden Elemente im EET lassen sich in miteinander interagierende Module untergliedern, welche homologe Gene in anderen Bakterien besitzen. Durch eine gezielte, simultane Klonierung dieser Gene sollte auf eine verbesserte Interaktion in der heterologen Expression zwischen den Modulen selektiert werden.

### Entwicklung eines Zielvektors

Als erster Schritt wurde dafür ein Vektor geschaffen, für welchen eine sequenzunabhängige Klonierung in *S. cerevisiae* möglich ist und welcher in möglichst vielen Bakterien stabil repliziert und exprimiert werden kann (Abb. 3.1). Eine plasmidbasierte funktionelle Expression des *eyfp*-Gens konnte in einem Vorversuch mit verschiedenen Induktionsstärken gezeigt werden (Abb. 3.2). Ein deutliches Signal konnte dabei schon durch eine Basalexpression detektiert werden, welches lediglich in geringem Ausmaß durch Induktion gesteigert werden konnte. Diese Basalexpression lässt sich womöglich durch eine Repression des Promotors durch Glukose senken. Für einen Nachweis der Funktionalität des Plasmids spielt dies zunächst jedoch keine Rolle, insbesondere da eine Glukoserepression aufgrund fehlender Transporter in einigen Organismen nicht möglich ist. Dies trifft unter anderem auf *S. oneidensis* zu, in dem das Plasmid weiter getestet werden soll (Rodionov *et al.*, 2010). Die hohe Basalexpression, welche durch das uninduzierte eYFP-Signal detektiert wurde, stellt jedoch zugleich eine Erklärung für das verringerte Wachstum dar (Abb. 3.2). Da durch eine konstitutive Expression des Plasmids eine metabolische Belastung eintritt, verringert sich bei gleicher Energieverwertung die maximal erreichbare Zellmasse, und somit auch die optische Dichte im Medium (Pasini *et al.*, 2016). Durch eine Steigerung der Induktion lässt sich neben einem korrelierenden Fluoreszenzsignal auch eine reziprok proportionale Zelldichte erkennen.

Aus diesem Vorversuch lässt sich ableiten, dass eine heterologe Expression grundsätzlich funktioniert und die Induktionsstärke nur eine untergeordnete Rolle spielt. Da sich die Induktionsstärke, je nach Organismus unterscheiden kann, ist eine stabile Basalexpression für diese Methode von Vorteil. Veränderungen der Induktionsstärke lassen jedoch Expressionsunterschiede zu und ermöglichen eine qualitative Einschätzung des Einfluss der exprimierten Gene auf den Phänotyp.

### Transformation

Die simultane Assemblierung des Plasmidsets ist fast vollständig gelungen und konnte im Konjugationsstam WM3064 nachgewiesen werden. Fehlende Konstrukte können vermutlich durch die Sequenzierung einer größeren Mischkultur identifiziert werden. Der anschließende Transfer der Plasmide in andere Organismen konnte zunächst exemplarisch an einem zweiten *E. coli* Stamm DH10B, *S. oneidensis* und *C. necator* gezeigt werden. Eine Zusammenfassung der Konstruktvarianten in diesen Organismen ist in Tab 4.1 dargestellt. (Abb. 3.5). Durch die Sequenzierung des Plasmidsets aus *C. necator* gelang der Nachweis einer stabilen Replikation in einen biotechnologisch interessanten Stamm, welcher phylogenetisch eine große Distanz zu den Modellorganismen *E. coli* und *S. oneidensis* aufweist. Zugleich konnte durch die Konjugation ein Transfer trotz erschwerter genetischer Zugänglichkeit gezeigt werden (Sydow *et al.*, 2017).

TABELLE 4.1: Statistische, prozentuale Verteilung der einzelnen Varianten der verschiedenen Module in vier verschiedenen Kulturen unabhängig. Die Verteilung basiert auf den Kombinationssequenzierungen aus Abb. 3.5.

<b>Modul</b>	<b><i>E. coli</i> WM3064</b>	<b><i>E. coli</i> DH10B</b>	<b><i>S. oneidensis</i></b>	<b><i>C. necator</i></b>
<i>mtoAB</i>	12,9	18,6	9,0	2,0
<i>pioAB</i>	26,3	36,3	23,2	71,6
<i>mtrAB</i>	60,8	45,1	67,7	26,4
<i>mtoD</i>	35,2	31,0	41,9	53,5
<i>stc</i>	35,9	47,5	32,9	37,6
<i>pioC</i>	28,9	21,5	25,2	8,8
<i>cymA<sub>ES</sub></i>	22,1	47,8	8,4	1,7
<i>cymA</i>	65,3	39,5	80,6	8,9
<i>napC</i>	12,6	12,7	11,0	89,3

Die Sequenzierung der Plasmidsets aus vier verschiedenen Stämmen zeigt einen deutlichen Unterschied in der Verteilung der Konstrukte und Module. Die Gründe hierfür können unter anderem an Unterschieden in der Replikationsmaschinerie und Homologien zu genomischen Sequenzen liegen, aufgrund einer Basalexpression aber auch an der *codon-usage* oder einer unterschiedlichen metabolischen Belastung bei der Expression. Bereits im ursprünglichen Genset im *E. coli* Stamm 3064 ist eine klare Favorisierung – in diesem Fall von *mtrAB* - zu sehen. Da in dieser Kultur kein Selektionsvorteil für einen äußeren Membrankomplex besteht, ist eine Selektion auf eine geringere metabolische Belastung eine plausible Erklärung. Da dies vor allem für die Replikation und Translation kleinerer Gene gilt, erscheint eine Favorisierung des *mtrAB<sup>s</sup>*-Clusters plausibel, welches mit 3115 bp kleiner ist als *mtoAB* (3525 bp) und *pioAB* (4087 bp).

Für das zweite Modul besteht in den Sequenzierungen beider *E. coli* Stämme und *S. oneidensis* eine nahezu ideale Gleichverteilung. Da diese Gene für relativ kleine Proteine kodieren, welche weder in Stoffwechselwegen und noch in eine Zellstruktur integriert sind, besteht vermutlich kein signifikanter Nachteil durch deren Replikation und Expression.

Im dritten Modul ist wieder für jeden Stamm eine klare Präferenz erkennbar. Auffällig sind eine Präferenz gegenüber *cymA* und eine Unterrepräsentation von *napC* in der ursprünglichen Kultur (*E. coli* WM3064). Werden die Sequenzierdaten für den zweiten *E. coli* Stamm (DH10B) miteinbezogen ist die geringe Anzahl an Kombinationen mit *napC* reproduzierbar, während dies für *cymA* nicht der Fall ist. Da *napC* das einzige Gen im Plasmidset ist, welches ebenfalls im *E. coli* Genom vorkommt, ist eine partielle Integration über homologe Sequenzen der Plasmide ins Genom denkbar. Da lediglich die Plasmidfraktion sequenziert wurde, konnten solche Ereignisse nicht untersucht werden.

In *S. oneidensis* zeigen sich für das erste und dritte Modul deutliche Präferenzen für endogene Modulvarianten. Für CymA ist eine funktionelle Schlüsselrolle in *S. oneidensis* bekannt, welche sich nur teilweise durch homologe Gene komplementieren lässt (Gescher *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2016; Cruz-García *et al.*, 2007). Der korrekte Einbau des äußeren Membranproteins MtrB ist zugleich bedeutend für den Zellmetabolismus, da fehlgefaltete Homologe durch einen proteolytischen Abbau eine zusätzliche metabolische Bürde darstellen (Marin, 2020).

Die Sequenzierergebnisse aus *C. necator* zeigen die deutlichsten Unterschiede. Die Kombination *pioAB* – *mtoD* – *napC* zeigt mit 50 % eine klare Präferenz gefolgt von *pioAB* – *stc* – *napC* mit 20 % (83.5). Auch wenn die Gründe hierfür unklar sind, zeigt sich in diesem Organismus bereits ohne einen bestimmten Selektionsdruck der Vorteil der c27-Strategie besonders deutlich. Die präferierten Genkombinationen entstammen je drei verschiedenen Organismen und kommen so in der Natur nicht vor. Ein Selektionsvorteil konnte im Rahmen dieser Arbeit für diesen Organismus jedoch noch nicht gezeigt werden.

### **Funktionalität in *S. oneidensis***

Für den Test der Methode, galt es zunächst einen funktionalen EET zweifelsfrei basierend auf den Genen des Plasmidsets zu realisieren. Da eine heterologe Expression wie bereits beschrieben von einigen weiteren, z.T. unbekanntenen Faktoren abhängt, wurde zunächst ein Stamm entwickelt, welcher grundsätzlich zum EET befähigt ist, dem jedoch die entscheidenden Schlüssel-Gene fehlen. Die Deletionen der Gene für CymA, STC, MtrAB sowie dem funktionellen STC-Analog FccA in *S. oneidensis* stellte eine passende Plattform bereit. Erwartungsgemäß, war die Deletionsmutante nicht zu einer Eisenreduktion befähigt (Abs. 2.1.4). Eine Expression des Plasmidsets stellte die Fähigkeit zur Eisenreduktion in der Kultur jedoch wieder her (Abb. 3.6). Da diese Kultur eine Mischung aus Stämmen darstellt, welche verschiedene Genkombination besitzen, lässt sich die zu Beginn vergleichsweise geringe Eisenreduktionsaktivität nicht eindeutig auf einen Stamm zurückführen. Stattdessen wird diese vermutlich nur durch einen Anteil der Kultur mit größerer Aktivität erreicht. Um den Stamm oder die Stämme zu isolieren, welche das Substrat am effektivsten mit einem Wachstum gekoppelt verwerten können, wurden mehrere Überführungen zur Selektion durchgeführt. Zwischen jeder Überführung konnte eine Steigerung der Eisenreduktionsrate gezeigt werden (Abb. 3.6). Nachdem keine weitere Steigerung der Eisenreduktionsrate erreicht wurde, wurde das Plasmidset in der Kultur isoliert und sequenziert. Das Ergebnis, dass nur ein Insert, *mtrAB<sup>s</sup>* – *stc* – *cymA* den ursprünglichen Phänotyp von *S. oneidensis* am besten wieder herstellt, demonstriert das Potenzial der Methode. Wie bereits beschrieben scheinen die im EET involvierten Proteine ein feinreguliertes Netzwerk aus c-Typ Cytochromen zu bilden, deren Interaktion einen Teil der einzigartigen metabolischen Flexibilität von *S. oneidensis* ausmachen (Ding *et al.*, 2014; Sturm, 2014; Marin, 2020).

### Heterologe Expression in *E. coli*

Da durch die Selektion des Plasmidsets in *S. oneidensis* gezeigt wurde, dass durch eine Selektion ein optimales Genset für den EET identifiziert werden kann, sollte diese Methode nun auf den Modellorganismus *E. coli* übertragen werden, welcher nicht zum EET befähigt ist. Das *screening* auf eine optimale Genkombination in *E. coli* ergab überraschend die einzige Kombination *cymA* – *stc* – *pioAB* (s. Abs. 3.1.4).

Dieses Ergebnis überrascht zunächst, da Elemente aus zwei EET-Ketten kombiniert werden, welche ursprünglich für verschiedene Stoffwechselwege fungieren. Während CymA und STC aus *S. oneidensis* für den Elektronentransport auf extrazelluläre Substrate für eine Atmung bestimmt sind, ermöglicht PioAB einen reversen Elektronentransport für die Regeneration von Reduktionsäquivalenten in der anoxygenen Photosynthese. Allerdings konnte für einen weiteren *R. palustris* Stamm (RP2) ebenfalls eine Anodenatmung gezeigt werden, was die Möglichkeit einer Umkehrung des EETs zeigt (Venkidusamy *et al.*, 2016). Die Gene für CymA und STC konnten bereits in vorherigen Arbeiten als vorteilhaft für einen EET in *E. coli* beschrieben werden (Gescher *et al.*, 2008; Beblawy *et al.*, 2020). Eine Überbrückung der äußeren Membran für einen EET ist in *E. coli* hingegen trotz vieler Bemühungen bisher nur unvollständig möglich und ermöglicht Reduktionsraten welche bedeutend geringer sind als in *S. oneidensis* (Jensen *et al.*, 2016).

Die heterologe Expression des äußeren Membranproteinkomplexes aus *S. oneidensis* offenbarte eine Reihe von Problemen: Bisher konnte keine korrekte Faltung des  $\beta$ -Fass-Proteins MtrB in *E. coli* nachgewiesen werden. Die relevanten Faktoren zum Einbau von MtrB sind noch nicht vollständig geklärt und scheinen teilweise von spezifischen Chaperonen abhängig zu sein (Marin, 2020). Zusätzlich ist der Mtr-Komplex in *S. oneidensis* abhängig von einem äußeren Membran-Cytochrom wie MtrC, welches in *E. coli* jedoch ebenfalls nicht korrekt lokalisiert zu sein scheint und dem Periplasma zugewendet ist. Spezies-spezifische Faktoren des Typ-II-Sekretionssystems konnten bereits in anderen Organismen identifiziert werden und sind für einen korrekten Einbau während der heterologen Expression notwendig (Francetic *et al.*, 2000). Das *E. coli* eigene System scheint in diesem Fall für den Einbau der äußeren Membran-Cytochrome unzureichend zu sein (Sturm-Richter, 2014).

Obwohl die *pioAB*-Gene gegenüber *mtrAB<sup>s</sup>* in der initialen Sequenzierung keine höhere Abundanz zeigten (s. 4.1), konnten sich diese Gene durch die Selektion auf Fe(III)-NTA durchsetzen. Ein Grund dafür, könnte die Funktionalität des PioAB-Moduls sein, welche unabhängig von einem weiteren äußeren Membrancytochrom wie MtrC ist. Dies konnte zwar auch mit der mutierten Variante MtrAB<sup>s</sup> in *S. oneidensis* gezeigt werden, jedoch besteht für diese eine veränderte Substratspezifität, da diese im Gegensatz zum Wildtyp in *S. oneidensis* nur lösliche Elektronakzeptoren reduziert (Bücking *et al.*, 2012).

Ein auffälliger Unterschied zwischen den beiden Proteinkomplexen, ist der komplexere Aufbau des *pioAB*-Clusters. So bildet sich die Struktur sowohl von MtrB als auch PioB aus 28  $\beta$ -Faltblättern, jedoch sind etwa 100 zusätzliche N-terminale Aminosäuren in PioB als hydrophile Schleifen ausgebildet (Jiao *et al.*, 2007). Diese sind vermutlich für eine Interaktion mit PioA bzw. MtrA verantwortlich. Entgegen der üblichen Orientierung von  $\beta$ -Fassproteinen zeigen diese Schleifen in das Periplasma (White *et al.*, 2013). In den periplasmatischen Schleifen von MtrB konnte ein CXXC-Motiv identifiziert werden, welches typisch für exoelektrogene Gammaproteobakterien ist (Wee *et al.*, 2014). Dieses scheint ebenfalls relevant für eine korrekte Faltung von MtrB zu sein (Marin, 2020). Dieses Motiv findet sich jedoch weder in PioB noch im bisher einzigen kristallisierten MtrB-Homolog aus *S. baltica* (Edwards *et al.*, 2020). Eine funktionale Faltung dieses Proteins in *E. coli*, könnte von diesem Motiv abhängen und eine Erklärung für die Selektion auf PioAB darstellen. In diesem Zusammenhang könnte eine Expression des *S. baltica* Gensets in *E. coli* ebenfalls interessant sein.

PioA unterscheidet sich von MtrA vor allem durch eine größere N-terminale Domäne, welche für eine korrekte Faltung des Apoproteins notwendig ist. Die Deletion eines Genabschnitts, welcher für 200 Aminosäuren nahe des N-terminus kodiert, zeigte weiterhin ein funktionales Protein, welches jedoch verglichen zum Wildtyp in geringeren Mengen vollständig exprimiert werden konnte (Gupta *et al.*, 2019). Diese Unterschiede zwischen PioAB und MtrAB scheinen insgesamt in erster Linie für die erfolgreiche Maturation und Faltung der Proteine von Bedeutung zu sein. Da für die heterologe Expression in *E. coli* die korrekte Faltung ein besonderes Problem darstellt, konnten hiermit neue Ansatzpunkte für einen verbesserten EET identifiziert werden.

Ein weiterer Faktor, welcher ebenfalls eine Rolle in der Kombination der Module spielen kann, sind die verschiedenen Redoxpotenziale der einzelnen Modulvarianten. Für das Modul der inneren Membran ist nur das Redoxpotenzialfenster für CymA bekannt, welches zwischen -260 bis -180 mV (vs. SHE) bestimmt wurde (Schwalb *et al.*, 2003). Aufgrund fehlender Werte kann für die Proteine der inneren Membran daher kein Vergleich über eine Interaktion mit periplasmatischen Proteinen gemacht werden.

Diese unterscheiden sich im Potenzial stark. PioC besitzt das höchste mit +450 mV (Bird *et al.*, 2014), gefolgt von MtoD mit +150 mV (Emerson *et al.*, 2013) und für die einzelnen Hämko-faktoren von STC belaufen sich diese zwischen -248 und -138 mV (Harada *et al.*, 2002). In der äußeren Membran bestimmt sich das Redoxpotenzial der einzelnen Kofaktoren zwischen -400 bis 0 mV (MtrA - Edwards *et al.*, 2020), -400 bis +100 mV (MtoA - Liu *et al.*, 2012) und -400 bis +250 mV (je vs. SHE) (PioA - Li *et al.*, 2020).

Die Werte der periplasmatischen Proteine MtoD und PioC liegen dabei über denen der äußeren Membrancytochrome, was dem Elektronentransport von außen nach innen unterstützt.

Für STC gilt dasselbe in umgekehrter Form, was eine Selektion für eine Eisenreduktion offensichtlich begünstigt.

Im Vergleich der äußeren Membrancytochrome sind hingegen nur geringe Unterschiede zu erkennen. Das Potenzialfenster dieser Cytochrome scheint jedoch in jedem Fall an eine Interaktion mit Eisenspezies angepasst zu sein, deren Redoxpotenzial im Bereich zwischen +100 und +400 mV (vs. SHE) liegt. Dies trifft auch auf Fe(III) NTA zu, welches mit +385 mV (vs. SHE) deutlich über dem Potenzial von PioA liegt und somit einen geeigneten Elektronenakzeptor darstellt (Straub *et al.*, 2001).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass diese Methode prädestiniert ist, um verbesserte, synthetische extrazelluläre Elektronentransportketten zu identifizieren und heterolog zu exprimieren.

Die Identifikation geeigneter Elemente ermöglicht darüberhinaus Einblicke in die Maturation alternativer Module, welche unabhängig von zusätzlichen Faktoren in der heterologen Expression möglich ist. So konnte in dieser Arbeit, mit dieser Methode eine neue, verbesserte EET-Kette in *E. coli* identifiziert werden.



## 4.2 Identifikation natürlicher EEA-Mechanismen

Für die Identifikation neuer EEA-Mechanismen diente die genetische Charakterisierung einer kathodischen Anreicherungskultur. Zunächst wurde dafür das Konsortium mittels einer Nanoporesequenzierung auf Genomebene charakterisiert (Abb. 3.9).

### Phylogenetische Analyse des Metagenoms

Da sich die Größe der Genome einzelner Organismen zum Teil stark unterscheiden kann, ist eine quantitative Aussage basierend auf sequenzierten DNA-Fragmenten nur begrenzt möglich. Aufgrund der hohen Diversität in der Probe und der unvollständig sequenzierten Einzelgenome, konnte eine Normalisierung auf einzelne Genomgrößen nicht durchgeführt werden. Die Ergebnisse zur Diversität zwischen den einzelnen Phyla sind daher innerhalb einer Probe bedingt vergleichbar. Der Vergleich zwischen den Proben ist jedoch möglich und aufgrund der Sequenzieretechnik geringeren methodischen Einflüssen unterworfen. Durch die direkte Sequenzierung der DNA-Fragmente ohne eine PCR-Vervielfältigung, ist ein präziseres Abbild der genetischen Abundanz eines Phylums möglich. Anhand des Vergleichs des kathodischen Konsortiums mit einer Referenzsequenzierung konnte die Anreicherung einer einzelnen Bakterienart gezeigt werden. Obwohl für diesen Organismus das Genom noch nicht geschlossen werden konnte, wurden 10 *contigs* identifiziert, welche ca. 87 % des Genoms repräsentieren und eine Teilcharakterisierung des Organismus ermöglichen.

### „*Ca. Tenderia sp.*“

Durch Sequenzvergleiche konnte eine Verwandtschaft zu dem ebenfalls aus einer kathodischen Anreicherung beschriebenen Bakterium „*Ca. Tenderia electrophaga*“ gezeigt werden. Basierend auf der 16S-rRNA-Identität mit 94,25 % ist eine Zugehörigkeit zu einem eigenen, neuen Genus jedoch wahrscheinlich. Als Schwelle für die Zuordnung eines neuen Genus gilt ein Wert von 94,5 % (Yarza *et al.*, 2014).

Die ANI zwischen beiden Organismen ist mit 84 % hingegen relativ hoch. Für eine 16S-rRNA-Identität unter 95 % ist eine ANI von etwa 70 – 75 % zu erwarten (Qin *et al.*, 2014). Da diese 10 *contigs* jedoch unter anderem durch ihre Identität zum Referenzgenom identifiziert wurden und diese das Genom nur zu ca. 87 % repräsentieren, ist die tatsächliche ANI vermutlich geringer. In jedem Fall handelt es sich bei dieser Anreicherung um eine neue Spezies und wird daher vorläufig als „*Ca. Tenderia sp.*“ bezeichnet. Im Gegensatz zu „*Ca. Tenderia electrophaga*“ handelt es sich nicht um ein marines Bakterium. Der Vergleich zwischen den beiden Organismen bietet sich daher an, um Gemeinsamkeiten zu identifizieren, welche unabhängig des Habitats für die EEA entscheidend sind.

Für eine präzisere Beschreibung wird eine Assemblierung eines geschlossenen Genoms angestrebt. Bei der Nanoporesequenzierung handelt es sich um eine recht junge Technologie, für die noch Erfahrungswerte fehlen, die denen einer Illuminasequenzierung entsprechen. Die Assemblierung des geschlossenen Genoms wurde für diese Arbeit daher nicht angestrebt, sollte jedoch mit einer Weiterentwicklung der entsprechenden bioinformatischen Tools in naher Zukunft möglich sein. Alternativ kann eine Resequenzierung mit höherer Sequenziertiefe durch Illumina- oder Nanopore-*reads* angestrebt werden.

Neben „*Ca. Tenderia sp.*“ konnte aus dem Metagenom keine weitere Anreicherung eines Phylums identifiziert werden. Die Ergebnisse des subtraktiven Genoms implizieren den einzigen signifikanten Unterschied auf einer Kathode durch die Anwesenheit von „*Ca. Tenderia sp.*“ (Abb. 3.10).

### **Metatranskriptom-Analysen**

Nachdem ein Schlüsselorganismus in der kathodischen Anreicherung identifiziert wurde, wurde für eine Bestätigung der elektroautotrophen Aktivität und der Identifikation der Schlüsselenzyme für einen EEA eine Sequenzierung des Metatranskriptoms durchgeführt.

Zunächst ist eine erfolgreiche Bestätigung der hohen metabolischen Aktivität von „*Ca. Tenderia sp.*“ festzustellen. Allerdings unterscheiden sich die Ergebnisse zwischen den einzelnen Jahren. Im Jahr 2019 konnten zwei weitere überdurchschnittlich aktive Phyla identifiziert werden. Da diese in der Metagenomsequenzierung unterrepräsentiert sind und zugleich in Datenbanken keine hinreichende Referenz vorkommt, kann keine verlässliche Aussage über die phylogenetische Zuordnung und Anzahl dieser Organismen gemacht werden. Jedoch handelt es sich um mindestens je einen Vertreter der Thaumarchaeota und Nitrospirae. Diese beiden Phyla sind insbesondere bekannt für eine Nitrifikation. Thaumarchaeota katalysieren dabei den ersten Schritt, die Oxidation von Ammonium zu Nitrit, während Nitrospirae den zweiten Schritt, die Oxidation von Nitrit zu Nitrat katalysieren (Nunes-Alves, 2016).

Die hohe Diskrepanz in der Abundanz dieser Organismen zwischen Metagenom und Metatranskriptom lässt sich womöglich auch durch einen methodischen Einfluss erklären. Einen entscheidenden Unterschied stellt die Probenvorbereitung für die Sequenzierplattformen dar. Für das Transkriptom wurden die Adapter PCR-basiert angehängt, für die Nanoporesequenzierung erfolgte eine Ligation der Adapter. Bisher wurde in der Literatur kein sequenzspezifischer Einfluss durch eine Adapterligation festgestellt, während eine PCR-basierte Verzerrung der tatsächlichen Sequenzabundanz bekannt ist (Aird *et al.*, 2011). Hierfür sprechen in diesem Datensatz insbesondere die extrem hohen Expressionswerte einzelner Gene im Metatranskriptom (Abs. 3.2.3).

## Nitrospirae und Thaumarchaeota

Ein methodischer Unterschied in der Sequenzierung müsste sich jedoch auch in der Sequenzierung der Versuche von 2018 stärker bemerkbar machen. Daher ist selbst bei einer Sequenziertechnik-bedingten Verzerrung ein Umwelteinfluss offensichtlich vorhanden. Bei der hohen transkriptionellen Aktivität der Nitrospirae und Thaumarchaeota, liegt der Verdacht einer erhöhten Ammoniumkonzentration nahe. Die Diskrepanz zur genomischen Abundanz lässt sich dabei durch eine kurzfristige Änderung der Konzentration erklären. Geringe Mengen DNA dieser Phyla lassen auf ein verringertes Wachstum im zeitlichen Rahmen vor der Probenahme schließen. Die hohe Menge RNA lässt hingegen auf eine hohe Aktivität dieser Phyla zum Zeitpunkt der Probennahme schließen. Das Expressionsmuster der Thaumarchaeota bildet in diesem Kontext ein schlüssiges Bild. Die höchst exprimierten Gene kodieren für S-Layer Proteine, welche für den Aufbau der Zellwand notwendig sind. Als zweites folgen Gene für Ammoniummonooxygenasen (*amoA*), die den ersten Schritt in der Ammoniumoxidation für eine Energiekonservierung katalysieren (Lehtovirta-Morley, 2018). Die Oxidation von Ammonium ist eine endergone Reaktion, welche durch die simultane Reduktion von Sauerstoff erfolgt. Hierfür werden zwei zusätzliche Elektronen aus der nachfolgenden Oxidation des Produkts Hydroxylamin genutzt. Das entsprechende Gen (*hao*), die Hydroxylaminoxidoreduktase konnte in der Anreicherung jedoch nicht identifiziert werden. Für die Oxidation von Hydroxylamin zu Nitrit in diesem Organismus dient womöglich teilweise eine hoch exprimierte Nitritreduktase (Kobayashi *et al.*, 2018; Lund *et al.*, 2012).

Die extrem hohe transkriptionelle Aktivität der Nitrospirae in der Kultur kann sich nicht mit Sicherheit auf eine Nitritoxidation zurückführen lassen. Es wurden lediglich wenige, gering exprimierte Gene identifiziert, welche in eine Nitritoxidation involviert sein können. Zu den höchstexprimierten Genen gehören hingegen Proteine, welche typischerweise als Elektronencarrier fungieren. Drei Monohäme, sowie ein Protein mit Kupfer-Cofaktor zeigen dabei die höchsten Expressionswerte. Homologe dazu sind bisher nicht bekannt. Eine Involvierung der *c*-Typ Cytochrome in eine Nitritoxidation ist dabei jedoch ebenso denkbar, wie in anderen Stoffwechselprozessen. Innerhalb der Nitrospirae finden sich interessanterweise auch bekannte Eisenoxidierer wie *Leptospirillum*, welche *c*-Typ Cytochrome für eine Eisenoxidation nutzen (Hippe, 2000). Die ebenfalls hohe Expression von Ferredoxin-oxidoreduktasen steht vermutlich im Zusammenhang mit der CO<sub>2</sub>-Fixierung, welche in Nitrospirae durch den rTCA-Zyklus erfolgt. Auch wenn dieser Zyklus aufgrund der verwendeten Enzyme als sauerstoffsensitiv bekannt ist, ist eine Fixierung in (mikro-)aeroben Nitrospirae möglich (Bar-Even *et al.*, 2012).

Aufgrund der geringen Datenlage (insbesondere im Metagenom) kann jedoch keine abschließende Aussage zur Bedeutung der Nitrospirae in der Anreicherung gemacht werden. Weitere Hinweise auf einen EEA können wohl erst durch eine weitere Beschreibung des Phylums auf Kathoden gewonnen werden.

### EEA in „*Ca. Tenderia sp.*“

Im Gegensatz zu den Thaumarchaeota und Nitrospirae ist für „*Ca. Tenderia sp.*“ eine nahezu vollständige Sequenzierung des Genoms erfolgt und die hohe kathodische Abundanz ist sowohl im Metagenom als auch im Metatranskriptom deutlich erkennbar. Die Expressionswerte in diesem Organismus zeigen dabei ein autotrophes Wachstum, wobei die CO<sub>2</sub>-Fixierung durch den Calvin-Zyklus erfolgt. Etwaige Lücken im zentralen Kohlenstoffmetabolismus entsprechen denen in „*Ca. Tenderia electrophaga*“. Ein Vergleich der beiden Spezies kann eventuell nach genauerer Betrachtung einen Aufschluss über die bisher nicht identifizierten Enzyme geben. Für diese Arbeit lag der Fokus jedoch auf dem Vergleich der EEA-Mechanismen.

Anders als in „*Ca. Tenderia electrophaga*“ scheinen in dieser Anreicherung einige *c*-Typ Cytochrome zu fehlen. Eddie *et al.*, (2017) identifizierten ein undecahäm, ein hexahäm und ein dihäem Cytochrom ähnlich dem *Cyc2* aus *A. ferrooxidans* als Elektronentransporter über die äußere Membran. Gene für diese Proteine konnten in der Anreicherung von „*Ca. Tenderia sp.*“ nicht identifiziert werden. Jedoch konnten drei weitere Monohämcytochrome und zwei Trihäm identifiziert werden, welche zugleich hohe Expressionswerte zeigen. Die beiden Trihäm sind durch hohe Expressionswerte auch schon in früheren Arbeiten aufgefallen (Eddie *et al.*, 2017), und befinden sich mit einem weiteren Trihäm (*Tel\_16530*) und einem Tetratricopeptid-repeat domain Protein (TRP – *Tel\_16525*) in einem coregulierten Cluster. TRPs sind in Protein-Protein Interaktionen involviert und wurden in *A. ferrooxidans* für den Aufbau einer Cytochrombrücke über die innere und äußere Membran postuliert (Castelle *et al.*, 2008). Die Trihäm Cytochrome selbst gehören zu einer Proteinfamilie, welche für die Ausbildung von *nanowires* in *G. sulfurreducens* charakterisiert sind (IPRO026352).

Neben diesen Cytochromen sind einige hochexprimierte Gene im Schwefelmetabolismus von „*Ca. Tenderia sp.*“ aufgefallen. Hierbei handelt es sich vor allem um Gene, welche als Schwefeltransferasen verschiedene Schwefelgruppen transferieren und oxidieren oder reduzieren können. Viele dieser Enzyme kommen mit verschiedenen Funktionen in den meisten Organismen vor. Das mit Abstand höchst exprimierte Gen im Schwefelmetabolismus kodiert für eine Rhodanase. Rhodanasen sind als Sulfid-oxidierende Enzyme bekannt, welche zugleich selbst Schwefelgruppen tragen können. Mögliche Funktionen der Rhodanasen umfassen den Transfer von Schwefelgruppen auf Cofaktoren wie Eisen-Schwefel-Cluster, eine Rolle in der Biosynthese von Aminosäuren oder eine Detoxifikation von Cyaniden, durch den Transfer einer Schwefelgruppe auf Cyanid (Cipollone *et al.*, 2007). In Prokaryoten wurde zu diesem Zweck eine Cysteindesulfurase identifiziert, welche *in vitro* einen Transfer des Schwefels von Cysteinen auf die Rhodanase katalysiert (Forlani *et al.*, 2005). In diesem Zusammenhang ist die hohe Expression eines solchen Gens in der „*Ca. Tenderia sp.*“ interessant. Eine weitere mögliche Funktion wurde in *A. ferrooxidans* beschrieben, in welchem eine hohe Expression des Rhodanase-Gens bei lithoautotrophen Wachstum gezeigt wurde (Ramírez *et al.*, 2002).

Eine Schnittstelle zu *c*-Typ Cytochromen stellt SoxC dar. Die Funktion von SoxC besteht in der Oxidation von Schwefelatomen aus Polysulfiden, wobei die Elektronen auf SoxD übertragen werden. Die genaue Reaktion ist nicht bekannt, vermutlich entsteht als Produkt jedoch eine Thiosulfatgruppe. Je zwei Monomere aus SoxC und SoxD bilden ein Heterotetramer im Periplasma. Bei SoxD handelt es sich um ein Mono- oder Dihäm-Cytochrom (Zander *et al.*, 2011; Dahl *et al.*, 2008). Ein Homolog konnte in der Anreicherung nicht identifiziert werden.

Ebenfalls als eines der höchst exprimierten Gene ist die Pyridinnukleotiddisulfid Oxidoreduktase eine Sulfid-Quinone Reduktase (SQR), welche die Oxidation von Sulfiden zu elementarem Schwefel katalysiert und die freiwerdenden Elektronen auf den Chinonpool in der inneren Membran überträgt. Die PAPS Sulfotransferase kann ebenfalls als Schlüsselement in einer Schwefeloxidation fungieren, jedoch besitzt dieses Enzym zumeist eine Funktion in der assimilatorischen Sulfat Reduktion. Für beide Enzyme sind Homologe in typischen Schwefeloxidierern wie *A. thiooxidans* bekannt (Yin *et al.*, 2014; Dahl *et al.*, 2008).

Für „*Ca. Tenderia sp.*“ konnten mehrere Elemente für einen potenziellen EEA identifiziert werden, welche jedoch zwei, bisher distinkt betrachteten EEA-Mechanismen zugeordnet wurden: Es konnten sowohl Gene für *c*-Typ Cytochrome, wie sie von Eisenoxidierern/-reduzierern benutzt werden, und Gene, welche in einer Schwefeloxidation beschrieben sind, identifiziert werden. In der Anreicherung kann es sich hierbei um eine zufällige Korrelation handeln, bei der sich ein Elektronentransport durch *c*-Typ Cytochrome und um eine ungewöhnliche Form der Schwefelassimilation handelt. Denkbar wären auch zwei parallele Mechanismen, welche unabhängig voneinander eine Energiekonservierung ermöglichen und dafür eventuell sogar verschiedene Elektronendonoren nutzen. Da jedoch beide Wege in diesem Organismus für sich genommen unvollständig zu sein scheinen, besteht ebenfalls die Möglichkeit einer kooperativen Interaktion dieser beiden Mechanismen. Dafür spricht, dass die beiden Mechanismen in mindestens zwei verschiedenen Organismen identifiziert wurden, welche ebenfalls unabhängig von einer Hydrogenase auf einer Kathode beschrieben wurden. In „*Ca. Tenderia electrophaga*“ ist ein Elektronentransport durch *c*-Typ Cytochrome impliziert. Ein Elektronentransport entsprechend einer Schwefeloxidation wird durch homologe Gene in den schwefeloxidierenden Bakterien *S. denitrificans* und *A. thiooxidans* denkbar, für welche ebenfalls eine kathodische Aktivität gezeigt werden konnte (Campos Rodrigues *et al.*, 2014). Als Schnittpunkt dieser beiden Mechanismen agiert vermutlich SoxC, welches Elektronen zwischen Schwefelgruppen und *c*-Typ Cytochromen transportieren kann. Ein hypothetisches Modell, welches einen möglichen EEA darstellt ist in Abb. 4.1 gezeigt.

In diesem Modell bestehen vor allem Unsicherheiten im Elektronentransport von der Kathode über die äußere Membran ins Periplasma, da keine Enzyme mit einem Signalpeptid für den Einbau in die äußere Membran oder gar für den Export der Proteine identifiziert werden konnten. Möglich wäre grundsätzlich ein Elektronentransport durch membranständige *c*-Typ

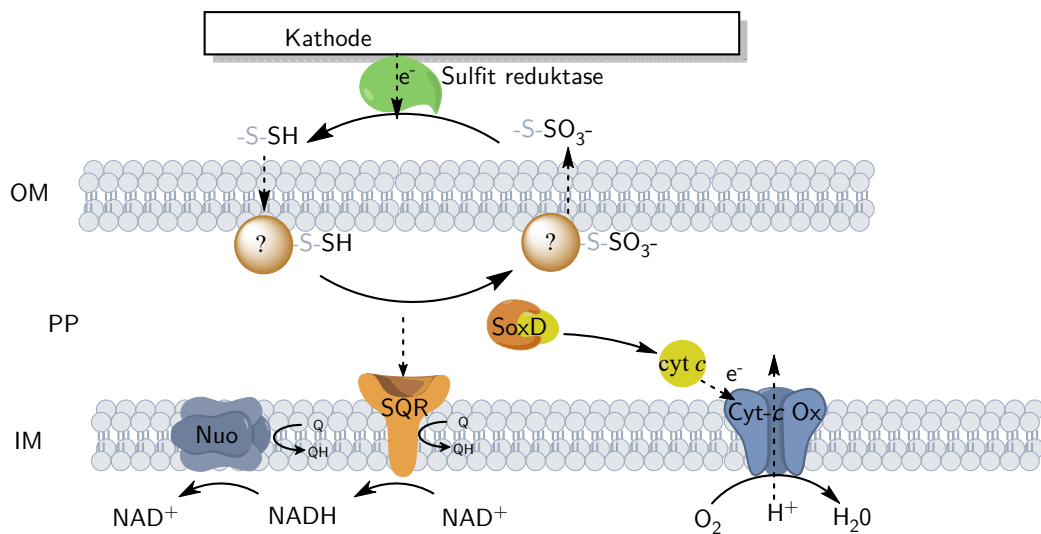


ABBILDUNG 4.1: Hypothetisches Modell der EEA-Kette in „*Ca. Tenderia* sp.“ während des Wachstums auf einer Kathode. Elektronen werden durch eine Sulfidreduktase auf eine Sulfurtransferase (Rhodanase, Cysteine /-desulfurase) übertragen, welche an der inneren Membran von SQR zur Reduktion des Chinonpools dienen oder im Periplasma von SoxD oxidiert wird. Die Elektronen aus SoxD gelangen über ein c-Typ Cytochrom auf eine Cytochrom c Oxidase zur Reduktion von Sauerstoff.

Cytochrome wie den Trihäm, welche *A. ferrooxidans* ähnliche *nanowire*-Strukturen zur Kathode ausbilden. Alternativ ist ein Elektronentransport durch Schwefelspezies mit verschiedenen Oxidationsstufen möglich. Obwohl ein entsprechender Mechanismus in den wenigsten Schwefeloxidierern beschrieben ist, stellt es den kritischen Schritt für die dissimilatorische Schwefeloxidation dar. Ein Transport erfolgt dabei für gewöhnlich durch eine vorherige Aktivierung (oder Reduktion) des unlöslichen S(0). Kleine Schwefelverbindungen wie Tetrathionat, Sulfide oder Proteine mit Sulfidgruppen werden über die Membran transportiert und im Periplasma oxidiert (Wang *et al.*, 2019). In der Anreicherung kommen laut Metatranskriptom als potenzielle elektronübertragende Schwefeltransferasen die Rhodanase, die Sulfidreduktase, die Cysteindesulfurase, die PAPS sulfotransferase und SoxD in Frage. In der Abbildung 4.1 ist die Sulfidreduktase stellvertretend für einen Elektronentransport und getrennt vom Membrantransport dargestellt. Jedoch kann es sich bei dem elektronenaufnehmenden Enzym an der Kathode und dem Elektronenshuttle um das gleiche Protein handeln. Zugleich kann das Shuttle entweder durch einen Transporter über die Membran transportiert werden oder selbst in der Membran verankert sein und lediglich die funktionelle Schwefelgruppe translokalisieren. Ähnliche Mechanismen sind für die Schwefeloxidation beschrieben (Wang *et al.*, 2019). Eine Oxidation der Schwefelgruppen im Periplasma kann anschließend durch die SQR für die Reduktion des Chinonpools oder von Reduktionsäquivalenten wie  $\text{NAD}^+$  erfolgen.

Für den Aufbau eines Protonengradienten werden die Elektronen aus der Schwefeloxidation in diesem Modell zunächst durch SoxD auf ein Mono- oder Dihäm Cytochrom transferiert und anschließend durch eine Cytochrom *c* Oxidase auf Sauerstoff übertragen.

Für eine präzisere Untersuchung der Mechanismen ist eine Isolation von „*Ca. Tenderia* sp.“ in Reinkultur anzustreben, um vergleichende Wachstumsanalysen mit verschiedenen Substraten wie Eisen(II), verschiedenen Schwefelspezies und Kathoden mit verschiedenen Potenzialen durchzuführen. Im Vergleich zu „*Ca. Tenderia electrophaga*“ bietet dieser Organismus dabei eine physiologische Anpassung an ein Habitat, welches im Labor leichter nachzustellen ist (Joint *et al.*, 2010).

### 4.3 Elektroautotrophie in *S. acidocaldarius*

Basierend auf vorherigen Arbeiten (Reiner *et al.*, 2020) und der Identifikation von schwefeloxidierenden Organismen auf der Kathode wurde eine potenzielle kathodische Aktivität von *Sulfolobus acidocaldarius* als Forschungsfrage aufgebaut. Durch die besondere biotechnologische Bedeutung, den außergewöhnlichen physiologischen Aspekten als hyperthermophiles Archaeon und der Funktion als genetisch zugänglicher Modellorganismus besitzt es dabei ein besonderes wissenschaftliches Interesse.

#### Elektroautotrophes Wachstum

Um die Fähigkeit zur Elektroautotrophie zu testen, wurde das Wachstum durch OCT-Messungen beobachtet. Der Vergleich auf einer Kathode bei -350 mV (*vs.* SHE) mit einem offenen Stromfluss (Abb. 3.15) zeigte ein deutliches Wachstum in Abhängigkeit des Potenzials. Das Potenzial bei -350 mV (*vs.* SHE) wurde dabei entsprechend der thermoacidophilen Kultivierung aus Reiner *et al.*, (2020) gewählt, durch die eine Anreicherung von Sulfolobaceae gelungen ist.

Geringere kathodische Potenziale führen bei gleichem Elektronenakzeptor zu einer größeren Potenzialdifferenz, und bieten somit einen höheren nutzbaren Energiebetrag für das Wachstum. Eine verbesserte Kultivierung konnte so z.B. in *K. spormannii* bei -500 mV (*vs.* SHE) gezeigt werden, welches aus genannter Anreicherung isoliert werden konnte (Reiner *et al.*, 2020). Im Vergleich des Biofilmwachstums von *S. acidocaldarius* mit verschiedenen Potenzialen, konnte jedoch kein stabiles Wachstum bei -500 mV (*vs.* SHE) beobachtet werden (s. Abb. A.3). Als möglicher Grund konnte ein instabiles Setup der Fließzellperipherie identifiziert werden. Das Potenzial in Kombination mit dem sauren Medium (pH = 2) ermöglicht eine Wasserstoffproduktion bereits bei einem Potenzial von -118 mV (*vs.* SHE). Eine hohe abiotische Wasserstoffproduktion ist für *S. acidocaldarius* jedoch nicht von Vorteil, da dieser nicht als Substrat verwertet werden kann. Das entstehende Gas und die reaktiven

Sauerstoffspezies, welche bei geringen Potenzialen gehäuft auftreten, können hingegen den Biofilm ablösen und das Wachstum hindern (Sultana *et al.*, 2015; Rismani-Yazdi *et al.*, 2008).

Das beobachtete Wachstum von *S. acidocaldarius* an der Kathode ist bemerkenswert, da bisherige Kulturen in Reinkultur lediglich aufgrund der elektrochemischen Aktivität im Stoffumsatz und dem Stromverbrauch als elektroautotroph charakterisiert sind (Abs. 1.4). Bei mikroskopischen Untersuchungen der Kathoden sind hingegen häufig nur wenige vereinzelte Zellen zu erkennen (Carbajosa *et al.*, 2010; Summers *et al.*, 2013; Ishii *et al.*, 2015). Ausnahmen sind hierbei *K. spormannii*, welches vermutlich vor allem auf Wasserstoff als Intermediat wächst (Reiner *et al.*, 2020), und die marine Anreicherung um „*Ca. Tenderia electrophaga*“, welches bisher nur durch kathodisches Wachstum in Kultur gehalten wird (Eddie *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2015). Darüberhinaus kann in den meisten elektroautotrophen Kulturen eine EEA durch eine abiotische Wasserstoffproduktion nicht ausgeschlossen werden und stellt vermutlich sogar einen entscheidenden Faktor dar (Philips, 2020). Neben *S. acidocaldarius* wurden erst zwei Isolate von nicht-hydrogenotrophen Schwefeloxidierern an Kathoden beschrieben (Campos Rodrigues *et al.*, 2014). Ein damit gekoppeltes Wachstum oder ein EEA-Mechanismus sind in diesem Zusammenhang jedoch nicht beschrieben. *S. acidocaldarius* ist somit der erste elektroautotroph wachsende Stamm, für den eine wasserstoffunabhängiger EEA gezeigt werden kann.

Hinweise auf einen direkten EEA liefert die Morphologie des Biofilms auf der Kathode. Gegenüber *K. spormannii*, welcher unter ähnlichen Bedingungen an der Kathode wächst bilden sich in *S. acidocaldarius* keine hohe turmartige Strukturen aus, sondern flachere, kreisförmige Kolonien, welche in erster Linie in die Breite wachsen (s. Abb. 3.15).

Um den EEA-Mechanismus in *S. acidocaldarius* zu charakterisieren, wurden vergleichende Transkriptomanalysen durchgeführt. Da *S. acidocaldarius* ursprünglich als Schwefeloxidierer beschrieben wurde, wäre ein Vergleich einer schwefeloxidierenden Kultur von Interesse gewesen. Eine auf elementarem Schwefel wachsende Kultur konnte in dieser Arbeit jedoch nicht beobachtet werden. Den Verlust der Fähigkeit zur Schwefeloxidation wurde für den charakterisierten Stamm DSM639 bereits in der Literatur beschrieben (Zeldes *et al.*, 2019). Umso mehr überrascht daher die Fähigkeit zu elektrotrophem Wachstum. Für diese Arbeit wurde daher der Vergleich zu einer heterotroph gewachsenen Kultur herangezogen.

Im Vergleich der einzelnen Transkriptome durch eine Hauptkomponentenanalyse (Abb. 3.19) fallen vergleichsweise große Unterschiede zwischen den beiden heterotroph gewachsenen Kulturen auf. Bei dieser Distanz handelt es sich jedoch um eine nicht unübliche Differenz zwischen zwei Kulturen, welche lediglich in diesem Vergleich auffällig ist. Im Vergleich mit weiteren Transkriptomen aus diesem Stamm aus der NCBI SRA-Datenbank (ERP015927) sind vergleichbare Unterschiede innerhalb eines Triplikats zu erkennen.



Eine Hauptkomponentenanalyse für einen Referenzdatensatz aus einer heterotrophen Kultur ist im Vergleich zu den elektrotrophen Kulturen in Abb. 4.2 gezeigt. Die deutlich ähnlichere metabolische Aktivität aus zwei elektrotrophen Kulturen lässt sich auf die Art der Kultivierung zurückführen. Durch eine Batch-Kultivierung auf organischen Substraten kommt es innerhalb eines relativ kurzen Zeitraums zu einer Substratlimitierung, welche einen größeren Einfluss auf die metabolische Aktivität hat. Unterschiede in der Wachstumsphase sind daher zwischen zwei Kulturen, selbst bei zeitgleicher Inokulation schneller erreicht. Auf der Kathode besteht eine kontinuierliche Versorgung mit frischem Substrat durch die Begasung und dem konstanten Potenzial an der Kathode. Die Versorgung mit Spurenelementen aus dem Medium ist durch das große Volumen von zwei Litern zur vergleichsweise geringen Anzahl an Zellen auf der Kathode ebenfalls nicht limitierend. Insgesamt entsprechen die Bedingungen im Elektrosynthesereaktor daher eher einem chemostatischen Verfahren.

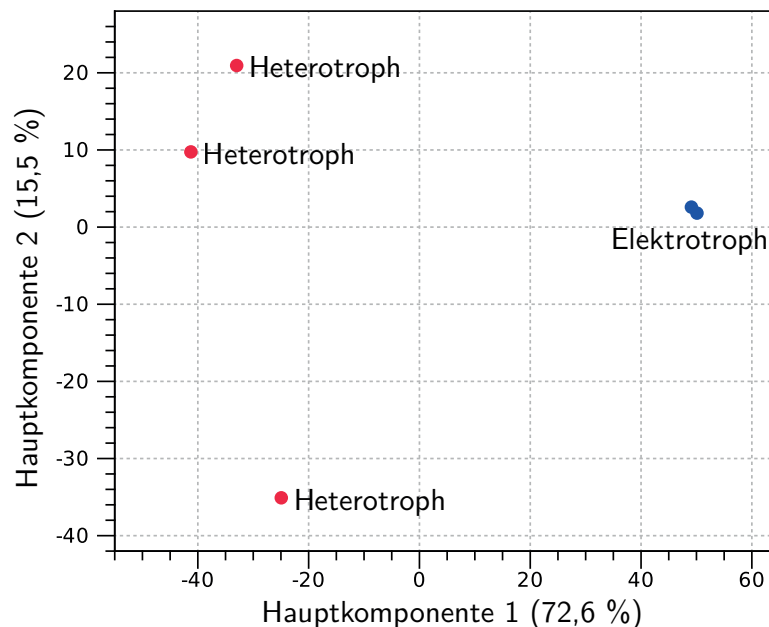


ABBILDUNG 4.2: Hauptkomponentenanalyse zum Vergleich der Transkriptome aus elektrotrophen Kulturen mit drei Transkriptomen aus heterotrophen Kulturen. Die Datensätze der heterotrophen Kulturen stammen vom Weizmann institute of science und sind in der NCBI SRA-Datenbank (ERP015927) hinterlegt.

Im Vergleich der beiden Kultivierungsbedingungen wurde zunächst ein autotrophes Wachstum auf der Kathode festgestellt. Die Gene, welche für Enzyme des 3-HP/4-HB Zyklus kodieren, sind auf der Kathode deutlich höher exprimiert. Abweichend von homologen Stoffwechselwegen in der Literatur scheint jedoch nicht das Gen *Saci\_0262* für das Schlüsselenzym im Zyklus, der 3-HP Carboxylase für das autotrophe Wachstum zu kodieren. Als alternative Carboxylase wurde ein Gen identifiziert, welches als Acetoacetyl-CoA-Decarboxylase annotiert

ist (*Saci\_1155*). Ein Vergleich der Reaktionen, die von diesen Enzymen katalysiert werden, ist in Abb. 4.3 dargestellt. Die Funktion der Acetoacetyl-CoA-Decarboxylase ist bisher nur in Clostridien beschrieben, welche mithilfe dieses Enzyms in der ABE-Fermentation Aceton produzieren. Eine Funktion in anderen Organismen ist nicht bekannt (Poehlein *et al.*, 2017).

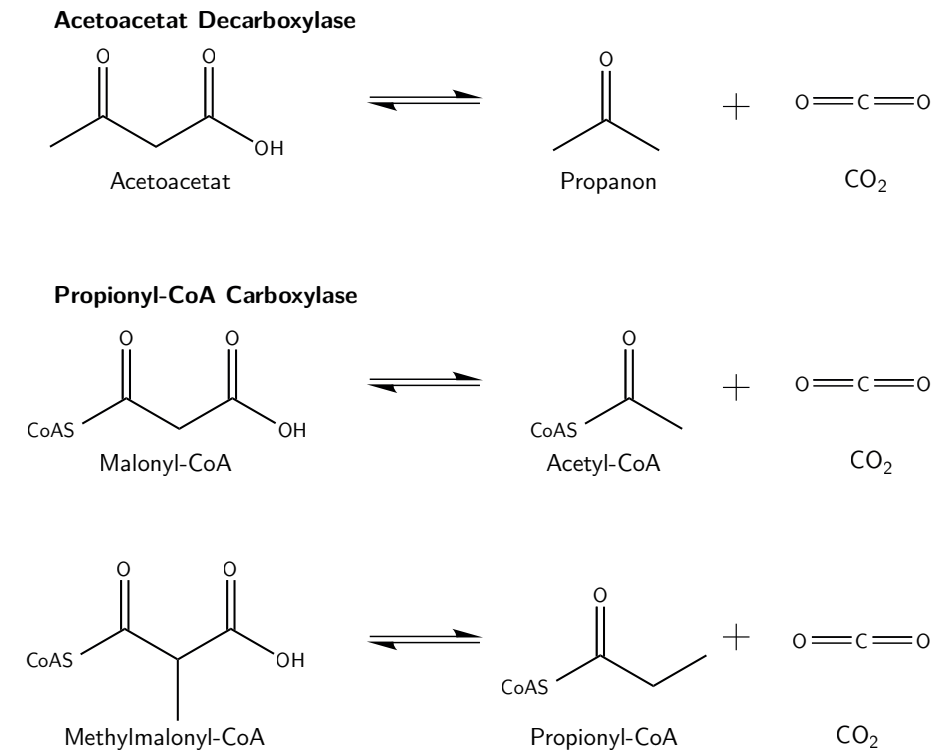


ABBILDUNG 4.3: Vergleich der Reaktionen, welche durch die Acetoacetat Decarboxylase und dem Schlüsselenzym im 3-HP/4-HB Zyklus, der Propionyl-CoA Carboxylase katalysiert werden. Als Substrat für die Propionyl-CoA Carboxylase können sowohl Propionyl-CoA, als auch Acetyl-CoA genutzt werden.

Da dieser Stamm laut Literatur die Fähigkeit zum lithoautotrophen Wachstum durch Überführungen im Labor verloren hat (Zeldes *et al.*, 2019; Wagner *et al.*, 2012) ist eine genetische Anpassung über modifizierte Stoffwechselwege wahrscheinlich. Ein ähnliches Bild zeigt sich für die Gluconeogenese in *S. acidocaldarius*. Estelmann *et al.*, (2011) zeigten für das Sulfolobales Archaeon *Metallosphaera sedula*, die den 3-HP/4-HB Zyklus nutzen, dass die Gluconeogenese nicht über eine Pyruvatsynthese aus Acetyl-CoA erfolgt, sondern Succinyl-CoA über Malat und Oxalacetat oxidiert wird und schließlich durch eine Decarboxylierung zu Pyruvat in die Gluconeogenese eingespeist wird. Als Grund hierfür wird die Sauerstoffsensitivität der Pyruvatsynthase angeführt. In *S. acidocaldarius* scheint hingegen die Pyruvat-Synthase (*Saci\_1088*) während der elektroautotrophen Kultivierung höher exprimiert zu sein (s. Abb. 3.21). Eine sauerstofftolerante Version einer Pyruvatsynthase

wurde jedoch ebenfalls beschrieben (Pieulle *et al.*, 1997) und scheint für die Funktionalität in aeroben Organismen notwendig zu sein, welche den rTCA-Zyklus für eine CO<sub>2</sub>-Fixierung nutzen (Hügler *et al.*, 2007; Yamamoto *et al.*, 2006).

Um die Rolle dieser Enzyme im autotrophen Wachstum besser zu verstehen sind jedoch weitere Versuche notwendig. Der Vergleich zu weiteren Vertretern der Sulfolobaceae, welche zu einem autotrophen Wachstum befähigt sind, sowie eine Überführung einer elektrotrophen Kultur auf Schwefel, können womöglich weitere Einblicke gewähren. Zu berücksichtigen ist in diesem Kontext vermutlich die mikroaerobe Gasphase mit lediglich 0,5 % Sauerstoff während der elektrotrophen Kultivierung.

### EEA-Mechanismen

Um die EEA Mechanismen in *S. acidocaldarius* zu identifizieren, wurden zunächst die Proteinkomplexe der inneren Membran für die Energiekonservierung betrachtet. Die Funktion von drei verschiedenen terminalen Oxidasen ist bisweilen unbekannt, scheint für das elektroautotrophe Wachstum jedoch eine Rolle zu spielen. Durch das Wachstum auf einer Kathode wurden die beiden Gencluster für SoxEFGHIM und DoxBCE höher exprimiert, während die Gene für SoxABCDL heterotroph hochreguliert sind. Ein ähnliches Expressionsmuster wurde während einer Substratlimitierung durch Bischof *et al.*, (2019) beschrieben. Als Grund hierfür wurde in diesem Fall die Aufrechterhaltung des intrazellulären pH-Werts aufgeführt. Durch den etwa neutralen intrazellulären pH-Wert (pH = 6,5) kann *S. acidocaldarius* den Protonengradienten zum sauren Medium für die ATP-Synthese nutzen, muss zugleich jedoch auf die Aufrechterhaltung des intrazellulären pH-Werts kontrollieren. Während eines Elektronendonor-Mangels kann daher der Protonengradient zwischenzeitlich für eine ATP-Synthese genutzt werden, und die Expression der terminalen Reduktasen angepasst werden, um den intrazellulären pH-Wert aufrecht zu erhalten. Der SoxEFGHIM-Komplex ist dabei in der Lage pro Elektron doppelt so viele Protonen zu transportieren. Zu diesem Expressionsmuster passt auch die verringerte Expression der ATP-Synthase, welche den umgekehrten Protonenfluss ermöglicht. Da an einer Kathode der lokale pH-Wert höher ist (Yuan *et al.*, 2013), ist dieses Expressionmuster eine logische Konsequenz während einer elektrotrophen Kultivierung. Für zukünftige Experimente sollte daher ein höheres Potenzial an der Kathode oder ein Medium mit geringerem pH-Wert getestet werden.

Als nächstes wurden Gene betrachtet, welche zum einen hohe Expressionswerte zeigten und gegenüber der heterotrophen Kultur hochreguliert sind. Besonders auffällig stach dabei ein Cluster aus 16 Genen heraus, welche zum größten Teil keine Annotation besitzen oder in Oxidation und Reduktion von Schwefelverbindungen involviert sind. Zeldes *et al.*, (2019) konnten dieses Gencluster durch Sequenzvergleiche zu anderen Sulfolobales in den Kontext der Schwefeloxidation setzen. Durch die Expression von zwei Genen aus

*Sulfolobus tokodaii* konnte eine Oxidation von Tetrathionat in *S. acidocaldarius* erreicht werden (ohne autotrophes Wachstum). Dafür wurden die Gene einer membrangebundenen Thiosulphate-Chinon-Oxidoreductase und eine Schwefel-Oxygenase-Reduktase exprimiert. Der Transport reduzierter Schwefelspezies über die Membran bleibt jedoch auch in diesem Fall unbekannt. Beim Vergleich zu homologen Genclustern in Sulfolobales fällt allerdings eine Insertion von vier Genen zwischen den *Hdr*-Genen auf, welche zusätzliche Homologe zu TusA, DsrE und SQR darstellen. Gerade diese vier Gene sind in der elektrotrophen Kultur jedoch besonders hochreguliert.

Da es sich bei Proteinen aus diesem Cluster zumeist um Sulfurtransferasen handelt, welche verschiedene Funktionen im Schwefelmetabolismus übernehmen können und homologe Funktionen zu denen in „*Ca. Tenderia sp.*“ erfüllen, wurde ein ähnliches Modell für einen EEA entwickelt und ist in Abb. 4.4 dargestellt.

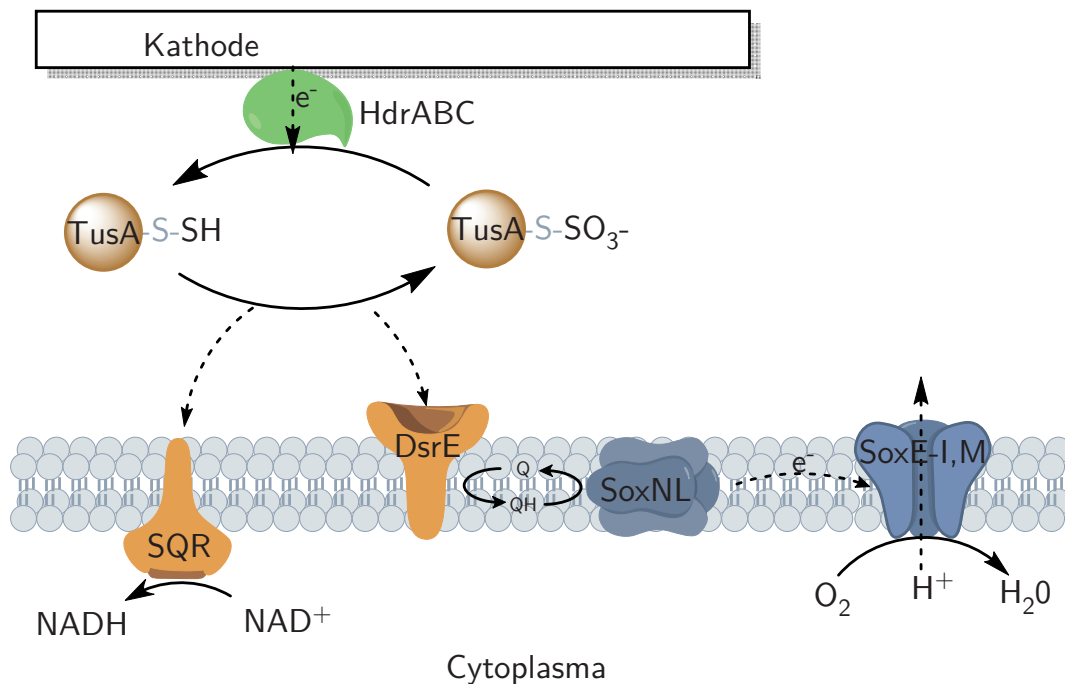


ABBILDUNG 4.4: Hypothetisches Modell der EEA-Kette in *S. acidocaldarius* während dem Wachstum auf einer Kathode. Elektronen werden durch eine Heterodisulfidreduktase (Hdr) auf eine Sulfurtransferase wie TusA übertragen, welche an der inneren Membran von SQR oder Dsr oxidiert wird. Die Elektronen gelangen von dort in den Chinon-pool und werden schließlich durch eine terminale Reduktase (SoxE-I,M) zur Reduktion von Sauerstoff genutzt.

Die größte Unsicherheit im Modell stellt auch hier der Transport reduzierter Schwefelverbindungen über die Membran dar. Die zusätzlichen Kopien verschiedener Sulfurtransferasen, welche besonders hoch exprimiert werden, stellen jedoch potenzielle Elektronenshuttles zu unlöslichen Elektronendonoren (wie Schwefel oder einer Kathode) dar. Eine elektroaktive Funktion und gesonderte Bedeutung der Heterodisulfidreduktase wurde darüberhinaus bereits auf Kathoden gezeigt (Jung *et al.*, 2021; Deutzmann *et al.*, 2015; Lienemann *et al.*, 2018). Stellvertretend für ein Elektronenshuttle ist im Modell TusA dargestellt, für welches besonders hohe Expressionswerte ermittelt wurden und eine zusätzliche Genvariante vorhanden ist. Aufgrund der früheren Beschreibung auf Kathoden wird als elektronentransferierendes Enzym an der Kathode der Hdr-Komplex vermutet. Der Transport zu verschiedenen Oxidoreduktasen der inneren Membran ist gänzlich ungeklärt und entsprechend nur durch punktierte Pfeile repräsentiert. Eine Rolle könnten in diesem Zusammenhang die unbekanntenen Gene *Saci\_1271* bzw. *Saci\_1272* (mit Membrandomäne) als Transporter spielen.

Für eine weitere Ausarbeitung dieser Hypothese sind jedoch weitere Versuche notwendig. Interessant wäre die Charakterisierung von weiteren Sulfobalancen an einer Kathode. Ebenso sollten Deletionsmutanten in *S. acidocaldarius* die Funktion einzelner Gene zeigen können. Durch die offenbar hohe genetische Fluidität in diesem Organismus, bietet sich auch eine Genomresequenzierung nach einem kathodischen Wachstum an. Diesbezüglich können auch weitere Hinweise auf das autotrophe Wachstum in diesem Phylum gewonnen werden.

## 4.4 Zusammenfassung und Ausblick

Die Charakterisierung des elektroautotrophen Wachstums von *S. acidocaldarius* bietet eine nachhaltige Erweiterung des Substratspektrums in diesem biotechnologisch hochinteressanten Modellorganismus. Für eine industrielle Anwendung müssen die Bedingungen für das elektroautotrophe Wachstum jedoch noch optimiert werden um die Umsatzraten auf ein wirtschaftlich konkurrenzfähiges Niveau zu bringen. Erste Ansatzpunkte für eine Optimierung des Mediums, genetische Anpassungen und des kathodischen Potenzials konnten bereits identifiziert werden. Am interessantesten sind jedoch Gene des Schwefelmetabolismus, welche im EEA hochexprimiert sind.

Die in dieser Arbeit zusammengetragenen Ergebnisse bieten eine neue Grundlage für die Erforschung elektroautotropher Organismen. Die Identifikation von Schwefeltransferasen als Elektronencarrier erfolgte außer in *S. acidocaldarius* auch in einer gezielten Umwelanreicherungskultur. Da es sich hierbei um den ersten näher beschriebenen Faktor handelt, welcher zugleich mit elektroautotrophem Wachstum in Verbindung gebracht werden konnte, bieten diese Gene einen vielversprechenden Ansatz um weitere elektrotrophe Organismen zu identifizieren. Insbesondere weitere Mitglieder der Sulfolobales, welche noch zur CO<sub>2</sub>-Fixierung befähigt sind, sollten auf einer Kathode charakterisiert werden. Die hyperthermophilen Eigenschaften dieser Archaea machen sie für einen Prozess zusätzlich interessant.

Alternativ können mit diesem Wissen, potenziell Mikroorganismen von biotechnologischem Interesse, durch heterologe Expression zu einem EEA befähigt werden und somit deren Substratspektrum erweitert werden. Insbesondere die Verwertung von CO<sub>2</sub> und den damit einhergehenden negativen Emissionen können entsprechende Prozesse schnell wirtschaftlich machen.

Eine entsprechende Methode konnte ebenfalls in dieser Arbeit entwickelt werden, durch welche Probleme in der heterologen Expression durch unbekannte Faktoren umgangen werden können. Die Identifikation von Sulfurtransferasen und mehreren *c*-Typ Cytochromen als potenzielle Elektronencarrier, bieten eine optimale Vorlage für eine Konstruktion einer synthetischen EEA-Kette in der heterologen Expression mit diesem System.

# Literatur

- Aird, Daniel *et al.*, (2011). „Analyzing and minimizing PCR amplification bias in Illumina sequencing libraries“. In: *Genome biology* 12.2, S. 1–14.
- Al-Mamoori, Ahmed *et al.*, (2017). „Carbon capture and utilization update“. In: *Energy Technology* 5.6, S. 834–849.
- Antunes, Luisa CS *et al.*, (2016). „Phylogenomic analysis supports the ancestral presence of LPS-outer membranes in the Firmicutes“. In: *Elife* 5, e14589.
- Aresta, Michele, Angela Dibenedetto und Antonella Angelini (2014). „Catalysis for the valorization of exhaust carbon: from CO<sub>2</sub> to chemicals, materials, and fuels. Technological use of CO<sub>2</sub>“. In: *Chemical reviews* 114.3, S. 1709–1742.
- Aulenta, Federico *et al.*, (2012). „Linking Bacterial Metabolism to Graphite Cathodes: Electrochemical Insights into the H<sub>2</sub>-Producing Capability of *Desulfovibrio* sp.“ In: *ChemSusChem* 5.6, S. 1080–1085.
- Bar-Even, Arren, Elad Noor und Ron Milo (2012). „A survey of carbon fixation pathways through a quantitative lens“. In: *Journal of experimental botany* 63.6, S. 2325–2342.
- Bassham, James Alan, Melvin Calvin und Andrew Alm Benson (1950). *The Path of Carbon in Photosynthesis: The Role of Malic Acid*. University of California Radiation Laboratory.
- Bathe, Stephan und Paul R Norris (2007). „Ferrous iron-and sulfur-induced genes in *Sulfolobus metallicus*“. In: *Applied and environmental microbiology* 73.8, S. 2491–2497.
- Beblawy, Sebastian, Laura-Alina Philipp und Johannes Gescher (2020). „Accelerated Electro-Fermentation of Acetoin in *Escherichia coli* by Identifying Physiological Limitations of the Electron Transfer Kinetics and the Central Metabolism“. In: *Microorganisms* 8.11, S. 1843.
- Beckwith, Christopher R *et al.*, (2015). „Characterization of MtoD from *Sideroxydans lithotrophicus*: a cytochrome *c* electron shuttle used in lithoautotrophic growth“. In: *Frontiers in microbiology* 6, S. 332.
- Beese-Vasbender, Pascal F *et al.*, (2015). „Selective microbial electrosynthesis of methane by a pure culture of a marine lithoautotrophic archaeon“. In: *Bioelectrochemistry* 102, S. 50–55.
- Bentley, David R *et al.*, (2008). „Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry“. In: *nature* 456.7218, S. 53–59.

- Berg, Ivan A *et al.*, (2010). „Autotrophic carbon fixation in archaea“. In: *Nature Reviews Microbiology* 8.6, S. 447–460.
- Bird, Lina J *et al.*, (2014). „Nonredundant roles for cytochrome *c*2 and two high-potential iron-sulfur proteins in the photoferrotroph *Rhodospseudomonas palustris* TIE-1“. In: *Journal of bacteriology* 196.4, S. 850–858.
- Bischof, Lisa F *et al.*, (2019). „Early response of *Sulfolobus acidocaldarius* to nutrient limitation“. In: *Frontiers in microbiology* 9, S. 3201.
- Boden, Thomas A, Gregg Marland und Robert J Andres (2017). „National CO<sub>2</sub> emissions from fossil-fuel burning, cement manufacture, and gas flaring: 1751-2014“. In: *Carbon Dioxide Information Analysis Center, Oak Ridge National Laboratory, US Department of Energy*.
- Bozell, Joseph J und Gene R Petersen (2010). „Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates—the US Department of Energy’s “Top 10” revisited“. In: *Green Chemistry* 12.4, S. 539–554.
- Bray, Nicolas L *et al.*, (2016). „Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification“. In: *Nature biotechnology* 34.5, S. 525–527.
- Brock, Thomas D *et al.*, (1972). „*Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature“. In: *Archiv für Mikrobiologie* 84.1, S. 54–68.
- Buchfink, Benjamin, Chao Xie und Daniel H Huson (2015). „Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND“. In: *Nature methods* 12.1, S. 59–60.
- Bücking, Clemens *et al.*, (2012). „Outer-membrane cytochrome-independent reduction of extracellular electron acceptors in *Shewanella oneidensis*“. In: *Microbiology* 158.8, S. 2144–2157.
- Butler, James H und Stephen A Montzka (2016). „The NOAA annual greenhouse gas index (AGGI)“. In: *NOAA Earth System Research Laboratory* 58.
- Buttler, Alexander und Hartmut Spliethoff (2018). „Current status of water electrolysis for energy storage, grid balancing and sector coupling via power-to-gas and power-to-liquids: A review“. In: *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 82, S. 2440–2454.
- Campos Rodrigues, Tatiana de und Miriam A Rosenbaum (2014). „Microbial electroreduction: screening for new cathodic biocatalysts“. In: *ChemElectroChem* 1.11, S. 1916–1922.
- Carbajosa, Sofía *et al.*, (2010). „Electrochemical growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on a graphite electrode for obtaining a biocathode for direct electrocatalytic reduction of oxygen“. In: *Biosensors and Bioelectronics* 26.2, S. 877–880.
- Castelle, Cindy *et al.*, (2008). „A new iron-oxidizing/O<sub>2</sub>-reducing supercomplex spanning both inner and outer membranes, isolated from the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*“. In: *Journal of biological chemistry* 283.38, S. 25803–25811.
- Cipollone, Rita, Paolo Ascenzi und Paolo Visca (2007). „Common themes and variations in the rhodanese superfamily“. In: *IUBMB life* 59.2, S. 51–59.



- Croal, Laura R, Yongqin Jiao und Dianne K Newman (2007). „The fox operon from *Rhodobacter* strain SW2 promotes phototrophic Fe (II) oxidation in *Rhodobacter capsulatus* SB1003“. In: *Journal of Bacteriology* 189.5, S. 1774–1782.
- Cruz-García, Claribel *et al.*, (2007). „Respiratory nitrate ammonification by *Shewanella oneidensis* MR-1“. In: *Journal of bacteriology* 189.2, S. 656–662.
- Dahl, Christiane und Cornelius G Friedrich (2008). *Microbial sulfur metabolism*. Springer.
- Deutzmann, Jörg S, Merve Sahin und Alfred M Spormann (2015). „Extracellular enzymes facilitate electron uptake in biocorrosion and bioelectrosynthesis“. In: *MBio* 6.2, e00496–15.
- Deutzmann, Jörg S und Alfred M Spormann (2017). „Enhanced microbial electrosynthesis by using defined co-cultures“. In: *The ISME journal* 11.3, S. 704–714.
- Ding, De-Wu *et al.*, (2014). „Identifying the potential extracellular electron transfer pathways from a *c*-type cytochrome network“. In: *Molecular BioSystems* 10.12, S. 3138–3146.
- Dinh, Hang T *et al.*, (2004). „Iron corrosion by novel anaerobic microorganisms“. In: *Nature* 427.6977, S. 829.
- Douzi, Badreddine, Alain Filloux und Romé Voulhoux (2012). „On the path to uncover the bacterial type II secretion system“. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367.1592, S. 1059–1072.
- Dumas, Claire, Régine Basseguy und Alain Bergel (2008). „Electrochemical activity of *Geobacter sulfurreducens* biofilms on stainless steel anodes“. In: *Electrochimica Acta* 53.16, S. 5235–5241.
- Eddie, Brian J *et al.*, (2017). „Metatranscriptomics Supports the Mechanism for Biocathode Electroautotrophy by *Candidatus Tenderia electrophaga*“. In: *mSystems* 2.2, e00002–17.
- Edwards, Marcus J *et al.*, (2020). „The crystal structure of a biological insulated transmembrane molecular wire“. In: *Cell* 181.3, S. 665–673.
- Emerson, David und Craig Moyer (1997). „Isolation and characterization of novel iron-oxidizing bacteria that grow at circumneutral pH.“ In: *Applied and environmental microbiology* 63.12, S. 4784–4792.
- Emerson, David *et al.*, (2007). „A novel lineage of proteobacteria involved in formation of marine Fe-oxidizing microbial mat communities“. In: *PloS one* 2.8, e667.
- Emerson, David *et al.*, (2013). „Comparative genomics of freshwater Fe-oxidizing bacteria: implications for physiology, ecology, and systematics“. In: *Frontiers in microbiology* 4, S. 254.
- Engel, Christina *et al.*, (2019). „Long-term behavior of defined mixed cultures of *Geobacter sulfurreducens* and *Shewanella oneidensis* in bioelectrochemical systems“. In: *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 7, S. 60.
- Engel, M *et al.*, (2018). „Kommt es in Elektrofermentationen mit *Clostridium acetobutylicum* zu einer Eisenlimitierung?“ In: *Chemie Ingenieur Technik* 90.9, S. 1154–1154.

- Estelmann, Sebastian *et al.*, (2011). „Labeling and enzyme studies of the central carbon metabolism in *Metallosphaera sedula*“. In: *Journal of bacteriology* 193.5, S. 1191–1200.
- Evans, MC, Bob B Buchanan und Daniel I Arnon (1966). „A new ferredoxin-dependent carbon reduction cycle in a photosynthetic bacterium.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 55.4, S. 928.
- Forlani, Fabio *et al.*, (2005). „The cysteine-desulfurase IscS promotes the production of the rhodanese RhdA in the persulfurated form“. In: *FEBS letters* 579.30, S. 6786–6790.
- Francetic, Olivera *et al.*, (2000). „Expression of the endogenous type II secretion pathway in *Escherichia coli* leads to chitinase secretion“. In: *The EMBO journal* 19.24, S. 6697–6703.
- Fuchs, Georg (2011). „Alternative pathways of carbon dioxide fixation: insights into the early evolution of life?“ In: *Annual review of microbiology* 65, S. 631–658.
- Fuchs, Georg und Hans-Günter Schlegel (2017). 10. Aufl. *Begründet von Hans-G. Schlegel Allgemeine Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart–New York.
- Gescher, Johannes S, Carmen D Cordova und Alfred M Spormann (2008). „Dissimilatory iron reduction in *Escherichia coli*: identification of CymA of *Shewanella oneidensis* and NapC of *E. coli* as ferric reductases“. In: *Molecular microbiology* 68.3, S. 706–719.
- Golitsch, Frederik (2016). „Entwicklung bioelektrochemischer Systeme für die Untersuchung von elektrodenabhängigen Konversionsprozessen“. In:
- Gralnick, Jeffrey A und Dianne K Newman (2007). „Extracellular respiration“. In: *Molecular microbiology* 65.1, S. 1–11.
- Gupta, Dinesh, Michael S Guzman und Arpita Bose (2020). „Extracellular electron uptake by autotrophic microbes: physiological, ecological, and evolutionary implications“. In: *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology: Official Journal of the Society for Industrial Microbiology and Biotechnology* 47.9-10, S. 863–876.
- Gupta, Dinesh *et al.*, (2019). „Photoferrotrophs produce a PioAB electron conduit for extracellular electron uptake“. In: *MBio* 10.6.
- Hackbarth, Max *et al.*, (2020). „Monitoring and quantification of bioelectrochemical *Kyrpidia spormannii* biofilm development in a novel flow cell setup“. In: *Chemical Engineering Journal* 390, S. 124604.
- Harada, Erisa *et al.*, (2002). „A directional electron transfer regulator based on heme-chain architecture in the small tetraheme cytochrome *c* from *Shewanella oneidensis*“. In: *FEBS letters* 532.3, S. 333–337.
- Harrington, Timothy D *et al.*, (2015). „Neutral red-mediated microbial electrosynthesis by *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Zymomonas mobilis*“. In: *Bioresource technology* 195, S. 57–65.
- Hartshorne, Robert S *et al.*, (2009). „Characterization of an electron conduit between bacteria and the extracellular environment“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106.52, S. 22169–22174.

- Hippe, Hans (2000). „*Leptospirillum* gen. nov.(ex Markosyan 1972), nom. rev., including *Leptospirillum ferrooxidans* sp. nov.(ex Markosyan 1972), nom. rev. and *Leptospirillum thermoferrooxidans* sp. nov.(Golovacheva et al. 1992).“ In: *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 50.2, S. 501–503.
- Holland, Stephen P (2008). „Modeling peak oil“. In: *The Energy Journal* 29.2.
- Holmes, Dawn E et al., (2019). „A membrane-bound cytochrome enables *Methanosarcina acetivorans* to conserve energy from extracellular electron transfer“. In: *MBio* 10.4, e00789–19.
- Holo, Helge und Reidum Sirevåg (1986). „Autotrophic growth and CO<sub>2</sub> fixation of *Chloroflexus aurantiacus*“. In: *Archives of microbiology* 145.2, S. 173–180.
- Hügler, Michael et al., (2007). „Autotrophic CO<sub>2</sub> fixation via the reductive tricarboxylic acid cycle in different lineages within the phylum Aquificae: evidence for two ways of citrate cleavage“. In: *Environmental Microbiology* 9.1, S. 81–92.
- Hyatt, Doug et al., (2010). „Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification“. In: *BMC bioinformatics* 11.1, S. 1–11.
- Ishii, Takumi et al., (2015). „From chemolithoautotrophs to electrolithoautotrophs: CO<sub>2</sub> fixation by Fe (II)-oxidizing bacteria coupled with direct uptake of electrons from solid electron sources“. In: *Frontiers in microbiology* 6, S. 994.
- Ishimoto, Yuki et al., (2017). *Putting costs of direct air capture in context*. Techn. Ber.
- Jensen, Heather M et al., (2016). „CymA and exogenous flavins improve extracellular electron transfer and couple it to cell growth in Mtr-expressing *Escherichia coli*“. In: *ACS synthetic biology* 5.7, S. 679–688.
- Jiao, Yongqin und Dianne K Newman (2007). „The *pio* operon is essential for phototrophic Fe (II) oxidation in *Rhodospseudomonas palustris* TIE-1“. In: *Journal of bacteriology* 189.5, S. 1765–1773.
- Joint, Ian, Martin Mühling und Joël Querellou (2010). „Culturing marine bacteria—an essential prerequisite for biodiscovery“. In: *Microbial biotechnology* 3.5, S. 564–575.
- Jourdin, Ludovic und Thomas Burdyny (2020). „Microbial Electrosynthesis: Where Do We Go from Here?“ In: *Trends in Biotechnology*.
- Jung, Tobias et al., (2021). „Improving the Cathodic Biofilm Growth Capabilities of *Kyrpidia spormannii* EA-1 by Undirected Mutagenesis“. In: *Microorganisms* 9.1, S. 77.
- Kanehisa, Minoru und Yoko Sato (2020). „KEGG Mapper for inferring cellular functions from protein sequences“. In: *Protein Science* 29.1, S. 28–35.
- Kaneko, Masahiro et al., (2017). „Cathodic supply of electrons to living microbial cells via cytocompatible redox-active polymers“. In: *Electrochemistry Communications* 75, S. 17–20.
- Kang, Dongwan D et al., (2019). „MetaBAT 2: an adaptive binning algorithm for robust and efficient genome reconstruction from metagenome assemblies“. In: *PeerJ* 7, e7359.

- Karst, Søren M *et al.*, (2021). „High-accuracy long-read amplicon sequences using unique molecular identifiers with nanopore or PacBio sequencing“. In: *Nature Methods*, S. 1–5.
- Kim, Hyung Joo *et al.*, (2002). „A mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*“. In: *Enzyme and Microbial technology* 30.2, S. 145–152.
- Kobayashi, Shun *et al.*, (2018). „Nitric oxide production from nitrite reduction and hydroxylamine oxidation by copper-containing dissimilatory nitrite reductase (NirK) from the aerobic ammonia-oxidizing archaeon, *Nitrososphaera viennensis*“. In: *Microbes and environments* 33.4, S. 428–434.
- Koblitz, Julia, Dietmar Schomburg und Meina Neumann-Schaal (2020). „MetaboMAPS: Pathway sharing and multi-omics data visualization in metabolic context“. In: *F1000Research* 9.
- Kolmogorov, Mikhail *et al.*, (2020). „metaFlye: scalable long-read metagenome assembly using repeat graphs“. In: *Nature Methods* 17.11, S. 1103–1110.
- König, Daniel Helmut *et al.*, (2016). „Power-to-Liquid (PtL): Vergleich der Nutzung von PEM Elektrolyse und reversen Wasser-Gas Shift Reaktion oder SOEC co-Elektrolyse“. In: Kovach, Michael E *et al.*, (1995). „Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes“. In: *Gene* 166.1, S. 175–176.
- Krieg, Thomas *et al.*, (2014). „Reactor concepts for bioelectrochemical syntheses and energy conversion“. In: *Trends in biotechnology* 32.12, S. 645–655.
- Langmead, Ben und Steven L Salzberg (2012). „Fast gapped-read alignment with Bowtie 2“. In: *Nature methods* 9.4, S. 357.
- Lehtovirta-Morley, Laura E (2018). „Ammonia oxidation: Ecology, physiology, biochemistry and why they must all come together“. In: *FEMS microbiology letters* 365.9, fny058.
- Li, Dao-Bo *et al.*, (2020). „His/Met heme ligation in the PioA outer membrane cytochrome enabling light-driven extracellular electron transfer by *Rhodospseudomonas palustris* TIE-1“. In: *Nanotechnology* 31.35, S. 354002.
- Li, Heng (2018). „Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences“. In: *Bioinformatics* 34.18, S. 3094–3100.
- Lienemann, Michael *et al.*, (2018). „Mediator-free enzymatic electrosynthesis of formate by the *Methanococcus maripaludis* heterodisulfide reductase supercomplex“. In: *Bioresource technology* 254, S. 278–283.
- Liu, Hong und Bruce E Logan (2004). „Electricity generation using an air-cathode single chamber microbial fuel cell in the presence and absence of a proton exchange membrane“. In: *Environmental science & technology* 38.14, S. 4040–4046.

- Liu, Juan *et al.*, (2012). „Identification and characterization of MtoA: a decaheme c-type cytochrome of the neutrophilic Fe (II)-oxidizing bacterium *Sideroxydans lithotrophicus* ES-1“. In: *Frontiers in microbiology* 3, S. 37.
- Ljungdahl, Lars G (1986). „The autotrophic pathway of acetate synthesis in acetogenic bacteria“. In: *Annual review of microbiology* 40, S. 415–450.
- Lohner, Svenja T *et al.*, (2014). „Hydrogenase-independent uptake and metabolism of electrons by the archaeon *Methanococcus maripaludis*“. In: *The ISME journal* 8.8, S. 1673.
- Lovley, Derek R und Elizabeth JP Phillips (1988). „Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese“. In: *Applied and environmental microbiology* 54.6, S. 1472–1480.
- Lund, Marie B, Jason M Smith und Christopher A Francis (2012). „Diversity, abundance and expression of nitrite reductase (nirK)-like genes in marine thaumarchaea“. In: *The ISME journal* 6.10, S. 1966–1977.
- Lutz, Rolf und Hermann Bujard (1997). „Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements“. In: *Nucleic acids research* 25.6, S. 1203–1210.
- Maitlis, Peter M und Arno de Klerk (2013). *Greener Fischer-Tropsch Processes: For Fuels and Feedstocks*. John Wiley & Sons.
- Makkar, NS und LE Casida Jr (1987). „*Cupriavidus necator* gen. nov., sp. nov.; a nonobligate bacterial predator of bacteria in soil“. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 37.4, S. 323–326.
- Mall, Achim *et al.*, (2018). „Reversibility of citrate synthase allows autotrophic growth of a thermophilic bacterium“. In: *Science* 359.6375, S. 563–567.
- Manchanda, Nancy *et al.*, (2020). „GenomeQC: a quality assessment tool for genome assemblies and gene structure annotations“. In: *BMC genomics* 21.1, S. 1–9.
- Marin, Lukas (2020). „Charakterisierung des  $\beta$ -Fass-Proteins MtrB“. Diss. Karlsruhe, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Diss., 2020.
- Martin, William und Michael J Russell (2003). „On the origins of cells: a hypothesis for the evolutionary transitions from abiotic geochemistry to chemoautotrophic prokaryotes, and from prokaryotes to nucleated cells“. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 358.1429, S. 59–85.
- McAllister, Sean M *et al.*, (2019). „The Fe (II)-oxidizing Zetaproteobacteria: historical, ecological and genomic perspectives“. In: *FEMS microbiology ecology* 95.4, fiz015.
- McCully, Alexandra L und Alfred M Spormann (2020). „Direct cathodic electron uptake coupled to sulfate reduction by *Desulfovibrio ferrophilus* IS5 biofilms“. In: *Environmental Microbiology* 22.11, S. 4794–4807.

- Milanzi, Sarah *et al.*, (2018). „Technischer Stand und Flexibilität des Power-to-Gas-Verfahrens“. In: *TU Berlin*.
- Miller, Jeffrey H (1972). *Experiments in molecular genetics*. NY Cold Spring Harbor Laboratory.
- Myers, Charles R und Judith M Myers (2002). „MtrB is required for proper incorporation of the cytochromes OmcA and OmcB into the outer membrane of *Shewanella putrefaciens* MR-1“. In: *Applied and environmental microbiology* 68.11, S. 5585–5594.
- Myers, Charles R und Kenneth H Nealon (1988). „Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor“. In: *Science* 240.4857, S. 1319–1321.
- Myers, Judith M und Charles R Myers (2000). „Role of the tetraheme cytochrome cymA in anaerobic electron transport in cells of *Shewanella putrefaciens* MR-1 with normal levels of menaquinone“. In: *Journal of bacteriology* 182.1, S. 67–75.
- Nevin, Kelly P *et al.*, (2010). „Microbial electrosynthesis: feeding microbes electricity to convert carbon dioxide and water to multicarbon extracellular organic compounds“. In: *MBio* 1.2, e00103–10.
- Newman, Jason R und Clay Fuqua (1999). „Broad-host-range expression vectors that carry the L-arabinose-inducible *Escherichia coli* araBAD promoter and the araC regulator“. In: *Gene* 227.2, S. 197–203.
- Nunes-Alves, Claudio (2016). „Do it yourself nitrification“. In: *Nature Reviews Microbiology* 14.2, S. 61–61.
- Paquete, Catarina M *et al.*, (2014). „Exploring the molecular mechanisms of electron shuttling across the microbe/metal space“. In: *Frontiers in microbiology* 5, S. 318.
- Paris-agreement (2015). „Paris agreement“. In: *Report of the Conference of the Parties to the United Nations Framework Convention on Climate Change (21st Session, 2015: Paris)*. Retrived December. Bd. 4. HeinOnline, S. 2017.
- Pasini, Martina *et al.*, (2016). „Using promoter libraries to reduce metabolic burden due to plasmid-encoded proteins in recombinant *Escherichia coli*“. In: *New biotechnology* 33.1, S. 78–90.
- Philips, Jo (2020). „Extracellular electron uptake by acetogenic bacteria: Does H<sub>2</sub> consumption favor the H<sub>2</sub> evolution reaction on a cathode or metallic iron?“ In: *Frontiers in Microbiology* 10, S. 2997.
- Pieulle, Laetitia, Valerie Magro und E Claude Hatchikian (1997). „Isolation and analysis of the gene encoding the pyruvate-ferredoxin oxidoreductase of *Desulfovibrio africanus*, production of the recombinant enzyme in *Escherichia coli*, and effect of carboxy-terminal deletions on its stability.“ In: *Journal of bacteriology* 179.18, S. 5684–5692.
- Poehlein, Anja *et al.*, (2017). „Microbial solvent formation revisited by comparative genome analysis“. In: *Biotechnology for biofuels* 10.1, S. 58.

- Qiao, Ya-Juan *et al.*, (2017). „Biofilm promoted current generation of *Pseudomonas aeruginosa* microbial fuel cell via improving the interfacial redox reaction of phenazines“. In: *Bioelectrochemistry* 117, S. 34–39.
- Qin, Qi-Long *et al.*, (2014). „A proposed genus boundary for the prokaryotes based on genomic insights“. In: *Journal of bacteriology* 196.12, S. 2210–2215.
- Quatrini, Raquel *et al.*, (2006). „Insights into the iron and sulfur energetic metabolism of *Acidithiobacillus ferrooxidans* by microarray transcriptome profiling“. In: *Hydrometallurgy* 83.1-4, S. 263–272.
- Quehenberger, Julian *et al.*, (2017). „*Sulfolobus*—a potential key organism in future biotechnology“. In: *Frontiers in microbiology* 8, S. 2474.
- Raabe, Dierk, Cem Tasan und Elsa A Olivetti (2019). „Strategies for improving the sustainability of structural metals“. In: *Nature* 575.7781, S. 64–74.
- Ramírez, Pablo *et al.*, (2002). „An exported rhodanese-like protein is induced during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in metal sulfides and different sulfur compounds“. In: *Applied and environmental microbiology* 68.4, S. 1837–1845.
- Reiner, Johannes Eberhard (2015). „Isolierung von elektroautotrophen Mikroorganismen“. Magisterarb. Karlsruhe, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Masterarbeit, 2015.
- Reiner, Johannes Eberhard *et al.*, (2020). „From an extremophilic community to an electroautotrophic production strain: identifying a novel Knallgas bacterium as cathodic biofilm biocatalyst“. In: *The ISME Journal* 14.5, S. 1125–1140.
- Rengasamy, Karthikeyan *et al.*, (2020). „Magnetite nanoparticle anchored graphene cathode enhances microbial electrosynthesis of polyhydroxybutyrate by *Rhodopseudomonas palustris* TIE-1“. In: *Nanotechnology* 32.3, S. 035103.
- Richter, Christaan (2019). *World's First Commercial CO<sub>2</sub> to Methanol Plant*. Techn. Ber. Georgia Institute of Technology.
- Riley, Lauren A und Adam M Guss (2021). „Approaches to genetic tool development for rapid domestication of non-model microorganisms“. In: *Biotechnology for Biofuels* 14.1, S. 1–17.
- Rismani-Yazdi, Hamid *et al.*, (2008). „Cathodic limitations in microbial fuel cells: an overview“. In: *Journal of Power Sources* 180.2, S. 683–694.
- Rodionov, Dmitry A *et al.*, (2010). „Genomic encyclopedia of sugar utilization pathways in the *Shewanella* genus“. In: *BMC genomics* 11.1, S. 1–19.
- Rowe, Annette R *et al.*, (2018). „Tracking electron uptake from a cathode into *Shewanella* cells: implications for energy acquisition from solid-substrate electron donors“. In: *MBio* 9.1.
- Sanger, Frederick, Steven Nicklen und Alan R Coulson (1977). „DNA sequencing with chain-terminating inhibitors“. In: *Proceedings of the national academy of sciences* 74.12, S. 5463–5467.

- Schemme, Steffen (2020). *Techno-ökonomische Bewertung von Verfahren zur Herstellung von Kraftstoffen aus H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub>*. Techn. Ber. Elektrochemische Verfahrenstechnik.
- Schicklberger, Marcus *et al.*, (2011). „Involvement of the *Shewanella oneidensis* decaheme cytochrome MtrA in the periplasmic stability of the  $\beta$ -barrel protein MtrB“. In: *Applied and environmental microbiology* 77.4, S. 1520–1523.
- Schwalb, Carsten, Stephen K Chapman und Graeme A Reid (2003). „The tetraheme cytochrome *cymA* is required for anaerobic respiration with dimethyl sulfoxide and nitrite in *Shewanella oneidensis*“. In: *Biochemistry* 42.31, S. 9491–9497.
- Schwander, Thomas *et al.*, (2016). „A synthetic pathway for the fixation of carbon dioxide *in vitro*“. In: *Science* 354.6314, S. 900–904.
- Shanks, Robert MQ *et al.*, (2006). „*Saccharomyces cerevisiae*-based molecular tool kit for manipulation of genes from gram-negative bacteria“. In: *Applied and environmental microbiology* 72.7, S. 5027–5036.
- Shi, Liang *et al.*, (2016). „Extracellular electron transfer mechanisms between microorganisms and minerals“. In: *Nature Reviews Microbiology* 14.10, S. 651–662.
- Stookey, Lawrence L (1970). „Ferrozine—a new spectrophotometric reagent for iron“. In: *Analytical chemistry* 42.7, S. 779–781.
- Straub, Kristina L, Marcus Benz und Bernhard Schink (2001). „Iron metabolism in anoxic environments at near neutral pH“. In: *FEMS microbiology ecology* 34.3, S. 181–186.
- Sturm, Gunnar (2014). „Periplasmatische Elektronentransfer-Reaktionen in *Shewanella oneidensis* MR-1“. Diss. Karlsruhe, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Diss., 2014.
- Sturm-Richter, Katrin (2014). „Etablierung und Intensivierung von Mikroben-Anoden-Interaktionen in synthetischen und natürlichen exoelektrogenen Stämmen“. Diss. Karlsruhe, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Diss., 2014.
- Su, Lin, Tatsuya Fukushima und Caroline M Ajo-Franklin (2020). „A hybrid *cyt c* maturation system enhances the bioelectrical performance of engineered *Escherichia coli* by improving the rate-limiting step“. In: *Biosensors and Bioelectronics*, S. 112312.
- Sultana, Sujala T, Jerome T Babauta und Haluk Beyenal (2015). „Electrochemical biofilm control: a review“. In: *Biofouling* 31.9-10, S. 745–758.
- Summers, Zarath M, Jeffrey A Gralnick und Daniel R Bond (2013). „Cultivation of an obligate Fe(II)-oxidizing lithoautotrophic bacterium using electrodes“. In: *MBio* 4.1, e00420–12.
- Sydow, Anne *et al.*, (2017). „Expanding the genetic tool box for *Cupriavidus necator* by a stabilized L-rhamnose inducible plasmid system“. In: *Journal of biotechnology* 263, S. 1–10.
- Tender, Leonard M *et al.*, (2008). „The first demonstration of a microbial fuel cell as a viable power supply: powering a meteorological buoy“. In: *Journal of Power Sources* 179.2, S. 571–575.



- Thöny-Meyer, L *et al.*, (1995). „*Escherichia coli* genes required for cytochrome *c* maturation.“ In: *Journal of Bacteriology* 177.15, S. 4321–4326.
- Ubando, Aristotle T, Charles B Felix und Wei-Hsin Chen (2020). „Biorefineries in circular bioeconomy: A comprehensive review“. In: *Bioresource technology* 299, S. 122585.
- Van Eerten-Jansen, Mieke CAA *et al.*, (2013). „Bioelectrochemical production of caproate and caprylate from acetate by mixed cultures“. In: *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 1.5, S. 513–518.
- Venkateswaran, Kasthuri *et al.*, (1999). „Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov.“ In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 49.2, S. 705–724.
- Venkidusamy, Krishnaveni und Mallavarapu Megharaj (2016). „A novel electrophototrophic bacterium *Rhodopseudomonas palustris* strain RP2, exhibits hydrocarbonoclastic potential in anaerobic environments“. In: *Frontiers in microbiology* 7, S. 1071.
- Vinod, A *et al.*, (2020). „Renewable and sustainable biobased materials: An assessment on biofibers, biofilms, biopolymers and biocomposites“. In: *Journal of Cleaner Production* 258, S. 120978.
- Von Canstein, Harald *et al.*, (2008). „Secretion of flavins by *Shewanella* species and their role in extracellular electron transfer“. In: *Applied and environmental microbiology* 74.3, S. 615–623.
- Wächtershäuser, Günter (2007). „On the chemistry and evolution of the pioneer organism“. In: *Chemistry & Biodiversity* 4.4, S. 584–602.
- Wagner, Michaela *et al.*, (2012). „Versatile genetic tool box for the crenarchaeote *Sulfolobus acidocaldarius*“. In: *Frontiers in microbiology* 3, S. 214.
- Wang, Rui *et al.*, (2019). „Sulfur oxidation in the acidophilic autotrophic *Acidithiobacillus* spp.“ In: *Frontiers in microbiology* 9, S. 3290.
- Wang, Zheng *et al.*, (2015). „A previously uncharacterized, nonphotosynthetic member of the *Chromatiaceae* is the primary CO<sub>2</sub>-fixing constituent in a self-regenerating biocathode“. In: *Applied and environmental microbiology* 81.2, S. 699–712.
- Watanabe, Kazuya *et al.*, (2009). „Electron shuttles in biotechnology“. In: *Current Opinion in Biotechnology* 20.6, S. 633–641.
- Wee, Seng K, Justin L Burns und Thomas J DiChristina (2014). „Identification of a molecular signature unique to metal-reducing *Gammaproteobacteria*“. In: *FEMS microbiology letters* 350.1, S. 90–99.
- Wei, Hehong *et al.*, (2016). „Functional roles of CymA and NapC in reduction of nitrate and nitrite by *Shewanella putrefaciens* W3-18-1“. In: *Microbiology* 162.6, S. 930–941.
- White, Gaye F *et al.*, (2013). „Rapid electron exchange between surface-exposed bacterial cytochromes and Fe (III) minerals“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.16, S. 6346–6351.

- Yamamoto, Masahiro *et al.*, (2006). „Role of two 2-oxoglutarate: ferredoxin oxidoreductases in *Hydrogenobacter thermophilus* under aerobic and anaerobic conditions“. In: *FEMS microbiology letters* 263.2, S. 189–193.
- Yarza, Pablo *et al.*, (2014). „Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences“. In: *Nature Reviews Microbiology* 12.9, S. 635–645.
- Yee, Mon Oo und Amelia-Elena Rotaru (2020). „Extracellular electron uptake in Methanosarcinales is independent of multiheme *c*-type cytochromes“. In: *Scientific Reports* 10.1, S. 1–12.
- Yin, Huaqun *et al.*, (2014). „Whole-genome sequencing reveals novel insights into sulfur oxidation in the extremophile *Acidithiobacillus thiooxidans*“. In: *BMC microbiology* 14.1, S. 1–14.
- Yuan, Yong, Shungui Zhou und Jiahuan Tang (2013). „In situ investigation of cathode and local biofilm microenvironments reveals important roles of OH<sup>-</sup> and oxygen transport in microbial fuel cells“. In: *Environmental science & technology* 47.9, S. 4911–4917.
- Zander, Ulrich *et al.*, (2011). „Structural basis for the oxidation of protein-bound sulfur by the sulfur cycle molybdohemo-enzyme sulfane dehydrogenase SoxCD“. In: *Journal of Biological Chemistry* 286.10, S. 8349–8360.
- Zeldes, Benjamin M *et al.*, (2019). „Determinants of sulphur chemolithoautotrophy in the extremely thermoacidophilic Sulfolobales“. In: *Environmental microbiology* 21.10, S. 3696–3710.
- Zhan, Yue *et al.*, (2019). „Iron and sulfur oxidation pathways of *Acidithiobacillus ferrooxidans*“. In: *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 35.4, S. 60.
- Zhong, Yuhong und Liang Shi (2018). „Genomic analyses of the quinol oxidases and/or quinone reductases involved in bacterial extracellular electron transfer“. In: *Frontiers in microbiology* 9, S. 3029.

## Anhang A

# Anhang

### **Digitaler Anhang**

Im digitalen Anhang dieser Arbeit befinden sich die in Abschnitt 2.6.2 erwähnten Skripte. `annotate.py` - Für die funktionelle und phylogenetische Einordnung von Proteinkodierenden Bereichen basierend auf einem BLAST-Ergebnis gegen die Uniprot-KB Datenbank.

`uniprot_db.py` - Für die Erstellung einer Uniprot-Datenbank im Fasta-Format ausgehen von einer `.dat`-Datei

`Uniprot_id.py` - für die Erstellung einer Datenbank, durch welche Uniprot-Identifikatoren wesentliche Annotationen zugeordnet werden können.

TABELLE A.1: Statistische Verteilung der Modulkombinationen in *E. coli* WM3064, *E. coli* DH10B, *S. oneidensis* und *C. necator*. Zahlen sind in Prozent angegeben und repräsentieren den Anteil den diese Kombination in der Sequenzierung aus dem entsprechenden Organismus ausmacht. Eine graphische Darstellung ist in Abb. 3.4 und 3.5 gezeigt.

<b>Modulkombination</b>	<b>WM3064</b>	<b>DH10B</b>	<b><i>S. oneidensis</i></b>	<b><i>C. necator</i></b>
<i>mtoAB - mtoD - cymAes</i>	2,95	0	0,29	0
<i>mtoAB - mtoD - cymA</i>	2,64	0,21	3,05	4,52
<i>mtoAB - mtoD - napC</i>	0	0	0	0
<i>mtoAB - stc - cymAes</i>	4,72	0	1,44	0
<i>mtoAB - stc - cymA</i>	0,88	0	3,26	0,65
<i>mtoAB - stc - napC</i>	1,47	1,85	1,44	2,58
<i>mtoAB - pioC - cymAes</i>	0,88	0	0,37	0
<i>mtoAB - pioC - cymA</i>	5,01	0	3,01	1,29
<i>mtoAB - pioC - napC</i>	0	0	0	0
<i>pioAB - mtoD - cymAes</i>	0	0	0,70	0
<i>pioAB - mtoD - cymA</i>	7,96	0,10	1,16	2,58
<i>pioAB - mtoD - napC</i>	3,24	49,85	4,833	5,81
<i>pioAB - stc - cymAes</i>	12,68	0,10	2,48	0
<i>pioAB - stc - cymA</i>	4,72	0,21	5,61	5,81
<i>pioAB - stc - napC</i>	5,90	21,13	3,38	1,29
<i>pioAB - pioC - cymAes</i>	0,59	0	0,50	0,65
<i>pioAB - pioC - cymA</i>	1,18	0,21	7,63	7,10
<i>pioAB - pioC - napC</i>	0	0	0	0
<i>mtrAB - mtoD - cymAes</i>	5,02	0	1,40	0
<i>mtrAB - mtoD - cymA</i>	9,1	3,38	23,76	29,03
<i>mtrAB - mtoD - napC</i>	0	0	0	0
<i>mtrAB - stc - cymAes</i>	12,09	0,92	6,56	7,10
<i>mtrAB - stc - cymA</i>	3,54	4,41	10,11	15,48
<i>mtrAB - stc - napC</i>	1,47	9,03	1,61	0
<i>mtrAB - pioC - cymAes</i>	8,85	0,72	8,37	0,65
<i>mtrAB - pioC - cymA</i>	4,42	0,41	7,71	14,19
<i>mtrAB - pioC - napC</i>	0,59	7,49	1,32	1,29

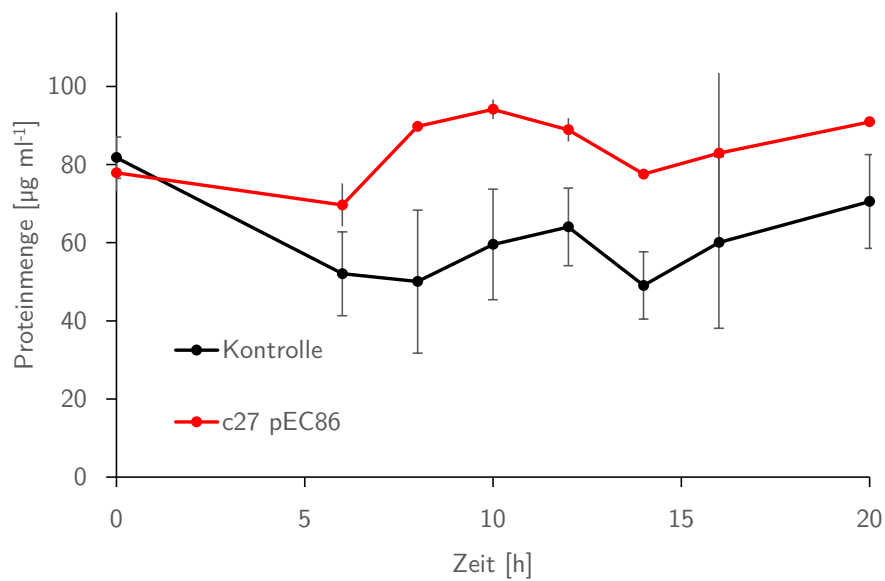


ABBILDUNG A.1: Entwicklung der Proteinmenge im Eisenreduktionsassay (Abb. 3.7). Die Proteinmenge wurde stellvertretend für die Zellmasse gemessen, da die optische Dichte im Medium nicht bestimmt werden konnte.

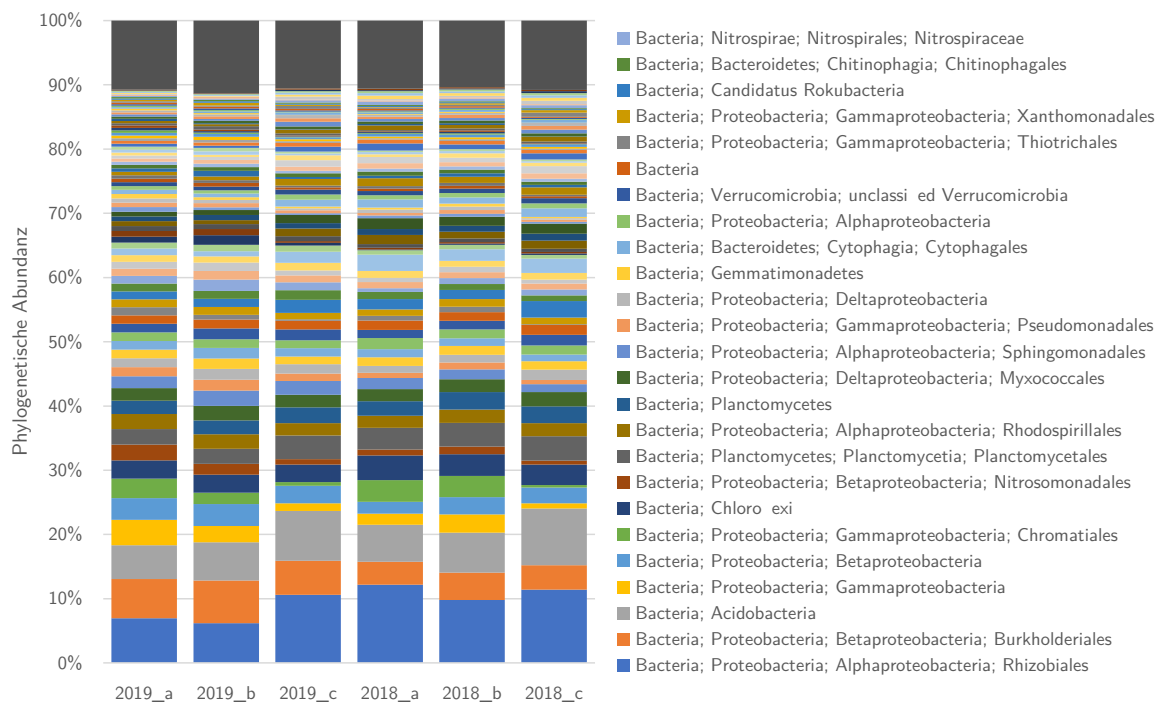


ABBILDUNG A.2: Graphische Darstellung der phylogenetischen Diversität in kathodischen Anreicherungskulturen (A+B) und nicht-kathodischen Kontrollkulturen (C), basierend auf Genomsequenzierungen. Die Balken repräsentieren den Anteil an proteinkodierenden Genen auf *reads*, welche einem Organismus zugeordnet werden konnten.

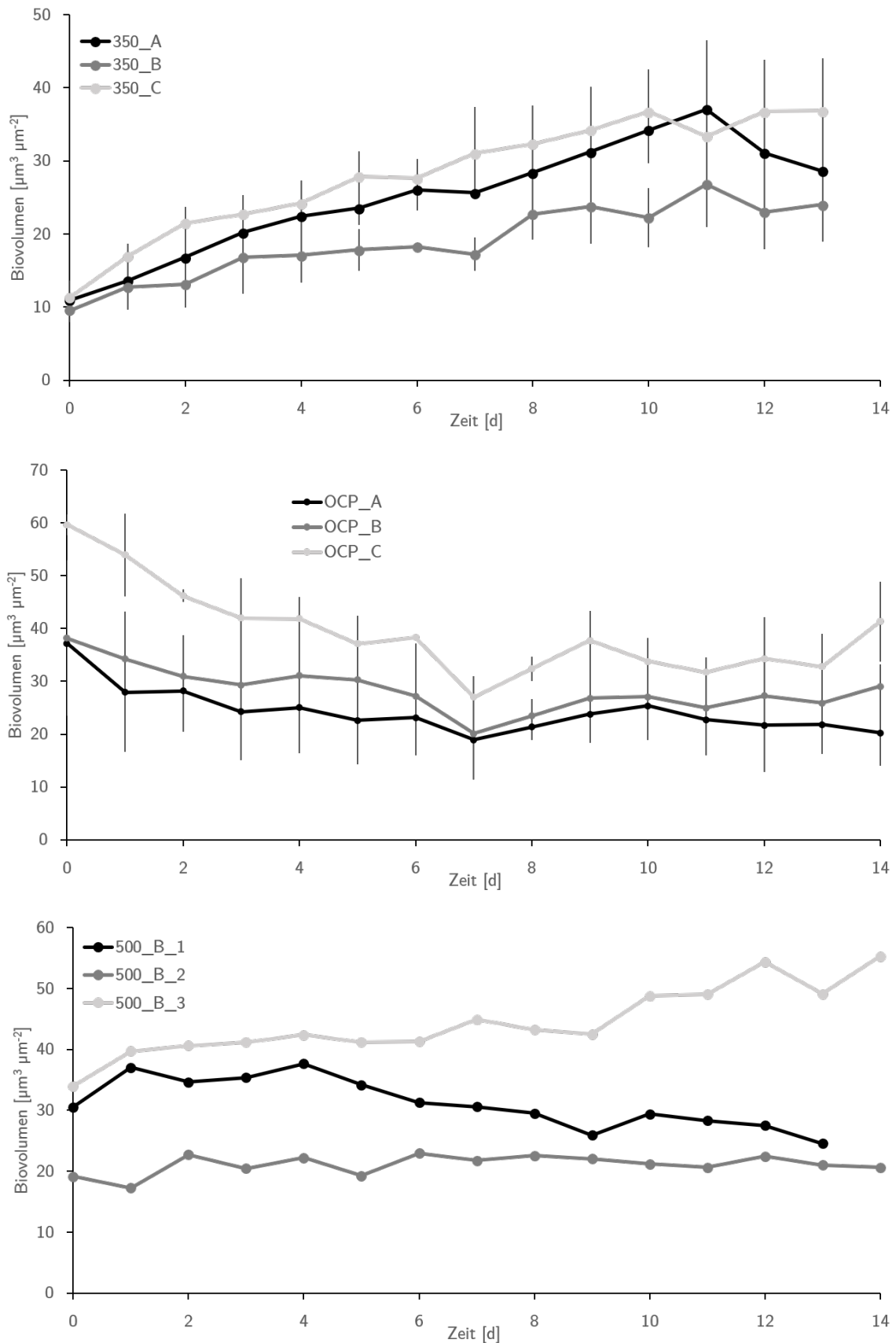


ABBILDUNG A.3: *S. acidocaldarius* Biofilmvolumen während der Kultivierung bei unterschiedlichen Potenzialen. Oben: bei -350 mV (vs. SHE), Mitte: in einem OCP-Versuch, Unten: bei -500 mV (vs. SHE). Die Stellen (A, B und C) entsprechen denen aus Abb. 3.15

# Veröffentlichungen & Konferenzbeiträge

Complete Genome Sequence of *Kyrpidia* sp. Strain EA-1, a Thermophilic Knallgas Bacterium, Isolated from the Azores. - 31 Jan 2018 *Genome Announcements*

Reiner JE, **Lapp CJ**, Bunk B, Spröer C, Overmann J, Gescher J

Development of a production chain from vegetable biowaste to platform chemicals. - 13 Jun 2018 *Microbial cell factories*

Schmidt A, Sturm G, **Lapp CJ**, Siebert D, Saravia F, Horn H, Ravi PP, Lemmer A, Gescher J

*Kyrpidia spormannii* sp. nov., a thermophilic, hydrogen-oxidizing, facultative autotroph, isolated from hydrothermal systems at São Miguel Island, and emended description of the genus *Kyrpidia*. - 20 Sep 2018 *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*

Reiner JE, Jung T, **Lapp CJ**, Siedler M, Bunk B, Overmann J, Gescher J

From an extremophilic community to an electroautotrophic production strain: identifying a novel Knallgas bacterium as cathodic biofilm biocatalyst - 29 Jan 2020 *ISME J*

Reiner JE, Geiger K, Hackbarth M, Fink M, **Lapp CJ**, Jung T, Dötsch A, Hügler M, Wagner M, Hille-Reichel A, Wilcke W, Kerzenmacher S, Horn H, Gescher J

## Konferenzbeiträge

Vortrag, September 2020; Thermophilic electrosynthesis of acetoin in *Sulfolobus*

- 3. International Bioeconomy Congress Baden-Württemberg - Online;

Poster, März 2019; Electrotrophic performance within the genus *Kyrpidia*

- Jahrestagung der *Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie* - Wolfsburg

# Danksagung

Die Arbeit ist geschrieben, die Dankbarkeit bleibt. Vielen, vielen Dank Johannes für so vieles. Fast genau acht Jahre ist es her, dass ich dich und das Labor kenne lernen durfte. Was ich seitdem hier erlebt habe, lässt mich keine Minute bereuen. Vielen Dank für die Zeit, die Ehrlichkeit, das Wissen und vor allem für die gebotenen Möglichkeiten. Die unglaubliche Vielfalt in diesem Labor - nicht nur, aber vor allem - in Thematik, Methodik und der wundervollen Gruppe sucht sicherlich ihresgleichen und spiegelt dein außergewöhnliches Engagement wieder. Ganz sicher hat diese Diversität viele spannende Aspekte, für einen jungen Geist in Ausbildung empfand ich es als unglaublich aufregende Lehrzeit.

Da geht der nächste Dank an Tobi, den Älteren. Danke für einen *großartigen* Start! Meine Begeisterung für die Mikrobiologie wurde sicherlich durch dich auf Bahn gebracht. Die Grundsätze die ich in zwei Wochen nicht nur durch Worte gelernt habe, werden mich noch lange begleiten. Danke.

Nicht nur zeitlich ungeschlagen, durfte ich durch dich Gunnar, intensiv erleben und lernen was präzises und wissenschaftliches Arbeiten bedeutet. Danke für eine *überragende* Zeit. Danke für einen Überfluss an Wissen und Gesprächen über alle Arten von Informationstechnik. Danke für Bier, Kicker und Geschichten. Danke für das Mentoring.

Einen nachhaltigen Dank an Ebi, den Experten – auch für Knallgasbakterien. Für neue Erfahrungen, das Erlebnis welche Freude diese Arbeit doch eigentlich bereiten kann und, dass diese Freude so viel bewirken kann. Das spannendste Thema, die faszinierendsten Mechanismen, danke für die Begeisterung zur Elektrosynthese. Im selben Zug – Danke Tobi Jung, Danke Max Hackbarth für die unschlagbare Kombination. Es war mir eine Freude so viele verschiedene Perspektiven und soviel Wissen zu einem Thema zu erleben. Danke euch allen auch für die Erfahrung, wie eine *Life-Work-Balance* stets nur Freude bereitet.

Niemand hat mich auf diesem Weg so lange und zuverlässig begleitet, niemand hat mir so sehr auf so vielen Weisen geholfen wie du Sabrina. Danke fürs Rücken freihalten, für Unterstützung, wenn ich sie am meisten gebraucht habe. Für neue Perspektiven, für das Zurückholen auf den Boden und vor allem für Dinge, die ich nicht in Worte fassen kann, und die du trotzdem verstehst. Ich hoffe du bleibst.



Danke auch dir und Büro2 für Büro2. Danke Nicola für die zuverlässige Unterstützung zu jeder Zeit. Danke Miri für Kuchen, gute Laune und Bespaßung. Danke Marie für einen neuen Blick, kompetente Hilfe und den Fokus aufs Ziel. Einen riesen Dank dir Lukas für die für mich lehrreichste Betreuung die ich leisten durfte;) Danke für die Begeisterung, die Fachkompetenz und den Blick über den Tellerrand. Mit eurer Hilfe war ich mir jeder Sache sicher. Danke.

Es gibt noch so vielen zu danken. Danke Mimi, für den klaren Kopf, danke Carina für die Ordnung, danke Sebastian für das Arbeitsklima, danke euch allen für die Erinnerung daran wie viel ich noch lernen darf. Danke Miri für wirklich kluge Hilfe, danke Edi für Wein und Karten. Danke Kerstin für eine vielversprechende Bioinfo, deine Hilfe und deine Unterstützung bei all den spannenden Dingen die kommen. *Tack så mycket* David for most interesting discussions. Und Vielen Dank, Laura für all die unscheinbare Hilfe, danke für klare Worte, gute Formulierung, für konstruktive Kritik und für schräge Ansichten die gerade deshalb spannend sind. Danke für die einzige Heimatverwandtschaft in Karlsruhe!

Danke an John und Morgan und der ganzen AG Kaster für jede Hilfe.

Zuletzt bleibt mir der Dank einer noch größeren Gruppe an Menschen. Vielen Dank meiner ganzen Familie. Danke meinen Eltern für Dinge die ich gerade erst zu verstehen lerne. Danke für die Unterstützung, für Dinge die ich vergesse und dass ihr mir all das ermöglicht habt. Danke meinen Geschwistern für – naja ihr wisst schon. Würde sowieso den Rahmen sprengen.

Schließlich den größten Dank Tina. Danke für die freudigste Zukunft die ich mir vorstellen kann. Danke für Sorgen die du in Freuden verwandelst, Danke für Freuden die nur Glück mit sich bringen. Wie auch immer du das schaffst, danke dafür was du mir ermöglicht hast, und die Zeit dabei so positiv gestaltetest. Ich freue mich auf jede Form der Zukunft mit dir, mit Klara, mit Linus.