

---

# A systematic approach to evaluating the effects of scaling up on the performance of bioelectrochemical systems using a technical scale microbial electrolysis cell

---

Robert Keith Brown<sup>a</sup>, Falk Harnisch<sup>b</sup>, Sebastian Wirth<sup>a</sup>, Helge Wahlandt<sup>c</sup>, Thomas Dockhorn<sup>c</sup>, Norbert Dichtl<sup>c</sup>, Uwe Schröder<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Environmental and Sustainable Chemistry, Technische Universität Braunschweig, Hagenring 30, 38106 Braunschweig, Germany.*

<sup>b</sup>*Department of Environmental Microbiology, Helmholtz-Centre for Environmental Research – UFZ, Permoserstr. 15, 04318 Leipzig, Germany*

<sup>c</sup>*Institute of Environmental and Sanitary Engineering, Technische Universität Braunschweig, Pockelsstr 2a, 38106 Braunschweig, Germany.*

\*author of correspondence; phone: +49 5313918425; fax: +49 5313918424, email:

[uwe.schroeder@tu-braunschweig.de](mailto:uwe.schroeder@tu-braunschweig.de)

## Abstract

In this article we discuss the challenges of the scaling up process of bioelectrochemical systems (BES) on the example of a microbial electrolysis cell (MEC) from the laboratory to the technical scale towards pilot scale. Therefore a technical scale MEC, in following referred to as “prototype”, anodically treating real wastewater from a local wastewater treatment plant (WWTP), was assessed in terms of its wastewater treatment efficiency, Coulomb efficiency (*CE*) and current generation compared to lab-based systems and the local WWTP. Operated in continuous mode at a hydraulic retention time of 1.23 d with an average COD-loading rate of  $0.5 \text{ g O}_2 \text{ d}^{-1} \text{ L}_{\text{Reactor}}^{-1}$  the prototype showed an average COD removal efficiency of 67 % with effluent concentrations of  $\bar{\varnothing} 210 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$  at a current generation of  $\bar{\varnothing} 72 \mu\text{A cm}^{-2}$  and  $\bar{\varnothing} CE$  of 11 %. We also show that ammonium can be eliminated at an average rate of  $17.8 \pm 3.9 \text{ mg N d}^{-1} \text{ L}_{\text{Reactor}}^{-1}$  resulting in effluent concentrations of  $30.7 \pm 3.7 \text{ mg N L}^{-1}$  in continuous mode operation, which corresponds to an average removal efficiency of  $40 \pm 7 \%$ . We describe and show a method for comprehensive performance evaluation which takes the above mentioned criteria into account and balances them against shifting treatment requirements. The prototype showed a performance factor of 0.75 in continuous mode operation in comparison to a real wastewater treatment plant. While this means that further development is certainly required it also illustrates that it should be possible to develop BES to a state in which they can compete even more with standard wastewater treatment systems.

**Key words:** Bioelectrochemical system, Microbial electrolysis cell, scaling up, technical scale, modeling

## 1 **1. Introduction**

2 While bioelectrochemical systems (BES) have been constantly improving in its widespread  
3 types microbial fuel cells (MFC) and microbial electrolysis cells (MEC) (Schröder et al.,  
4 2003; Schröder, 2011; Oliveira et al., 2013), there are only few studies that focus on technical  
5 operating parameters and scaling-up. Examples of operational parameters that have been  
6 studied are the effects of pH (Patil et al., 2011) or temperature (Patil et al., 2010) on current  
7 generation and of substrate loading on Coulombic efficiency (Sleutels et al., 2011).  
8 Furthermore, a plethora of studies devoted to the investigation and engineering of single  
9 components of BES exists in an ever increasing number, e.g. on electrode materials and  
10 architecture (Chen et al., 2011) or ion exchange membranes (Harnisch et al., 2008). However,  
11 the majority of the publically available experimental studies were performed on a lab-scale,  
12 with reactors of less than 1L-reactor volume and often using synthetic or very defined waste  
13 waters - see e.g. (Pant et al., 2010) for an overview. The process of scaling up BESs has been  
14 the subject of several studies and is one of the critical research areas for the success,  
15 especially, of BES in the field of wastewater treatment (Logan, 2010; Cheng and Logan,  
16 2011; Kim et al., 2012). As scaling up BES from the lab-scale via the technical to pilot and  
17 even larger scales is a truly multidisciplinary endeavor, and detailed information on all the  
18 relevant operating parameters is required, especially those allowing benchmarking BES to  
19 conventional technologies.

20 For this study a MEC was chosen, as these in comparison to MFCs i) presently allow a more  
21 precise electrochemical control and ii) are potentially an economically more promising  
22 solution (Foley et al., 2010). We purposefully used an underperforming reactor to begin with  
23 in order to gauge the effects of technical improvements such as dead space reduction or  
24 improving the flow regime on the performance of a technical scale MEC while also  
25 determining the effects of decreasing hydraulic retention times while increasing COD loading  
26 rates. Using the data gained from laboratory, literature, technical scale MEC and the local  
27 WWTP a comprehensive model for accessing the performance of BESs in comparison to one  
28 another and to aerobic treatment systems was developed.

29

## 30 **2. Materials and Methods**

31 This study incorporates results from experiments performed in small laboratory reactors and a  
32 technical scale reactor, which will be referred to in the following as the “prototype”.

33 **2.1. Chemicals**

34 All chemicals were obtained from Sigma–Aldrich, Germany or Carl Roth, Germany and were  
35 of analytical grade. Nitrogen gas (99.99%) was obtained from Linde Gas, Germany.

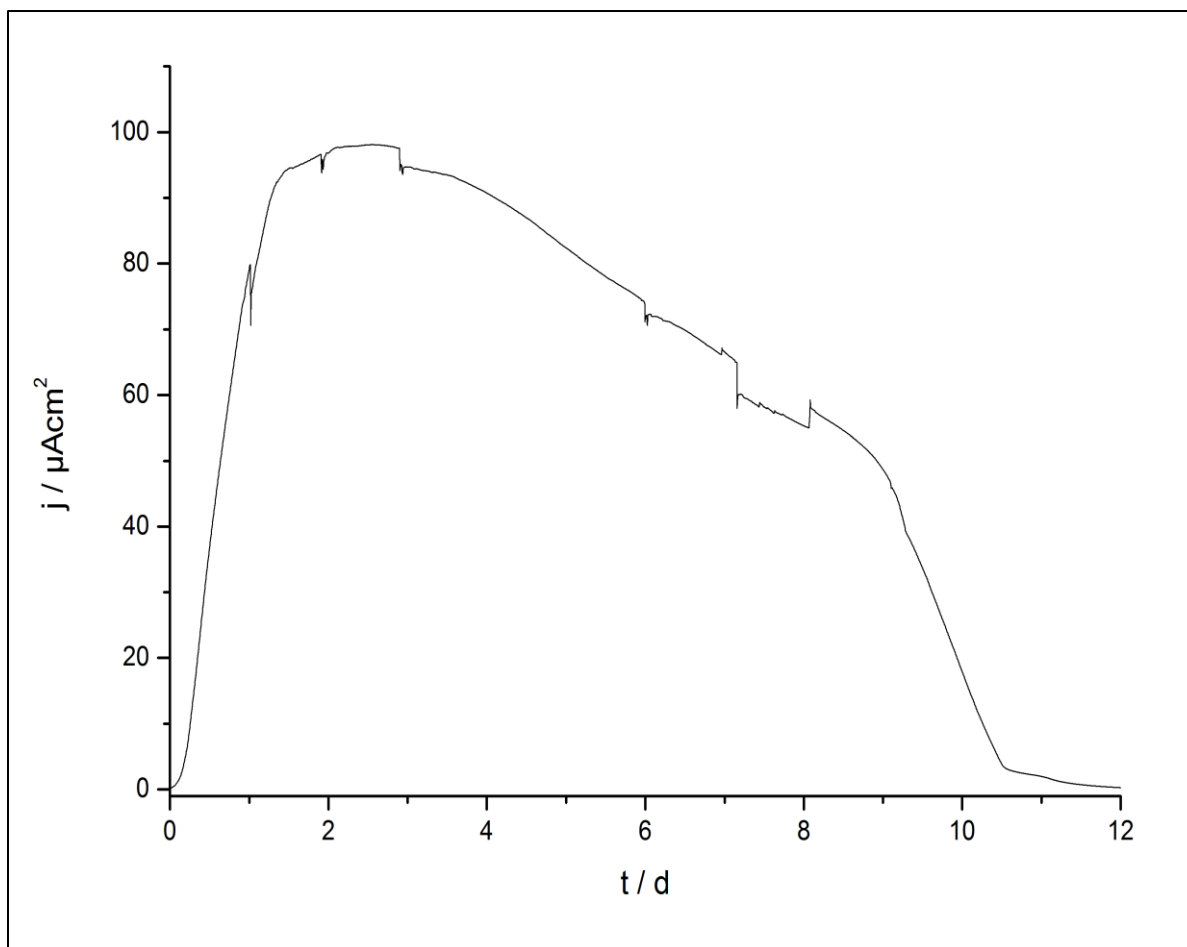
36 **2.2. Wastewater, inoculum and buffer solution**

37 Primary effluent, effluent after primary settling tank (EAPS) and effluent treatment plant  
38 (TPE) wastewater were derived from the wastewater treatment plant (WWTP) “Steinhof”  
39 (KWS), Braunschweig, Germany. The wastewater used in the prototype was filtered with a  
40 1.5 mm household sieve to remove particles which could cause clogging in the tubing or  
41 pumps.

42 The synthetic wastewater used in the prototype experiments was a standard growth medium  
43 according to Kim *et al.* (Kim et al., 2005), supplemented with sodium acetate (10 mM or 20  
44 mM) and a vitamin and trace metal solution prepared according to Balch *et al.*  
45 (Balch et al., 1979). Primary effluent served as the inoculum at a volumetric ratio of 1:20 in  
46 the first cycle of each batch. Two biologically independent replicates with 4 closed-loop batch  
47 cycles were conducted whereby the prototype was completely cleaned and restarted between  
48 the sets. The formation of an electrochemically active biofilm was recognized by a significant  
49 increase of a current flow, see Figure 1.

50 EAPS was used in laboratory batch experiments and prototype trials in closed-loop fed-batch  
51 experiments. The prototype reactor was not cleaned and the biofilm was the one grown on  
52 acetate during the synthetic wastewater experiments. In the first and third phase of the  
53 continuous mode trials the prototype was operated on EAPS. For the second phase of  
54 continuous mode operation EAPS was replaced by TPE spiked with sodium acetate solution  
55 to a concentration corresponding to 650 - 1250 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> equivalents of chemical oxygen  
56 demand (COD). The final COD concentration was measured after 30 min of mixing after  
57 spiking.

58



59  
60 **Figure 1:** Example of the development of the current density over time in growth cycle using  
61 synthetic wastewater supplemented with 10 mM acetate and operated at a temperature of  
62 25 °C.  
63

64 Wastewater in the storage tank was purged with nitrogen for at least 30 min after each  
65 refilling of the storage tank in order to remove oxygen and establish anaerobic conditions.

66 For batch operation a phosphate buffer solution (0.5 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 0.5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7)  
67 was used as the catholyte solution. After switching to continuous mode operation carbonate  
68 buffer (0.5 M NaHCO<sub>3</sub> and 0.5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 10) was used.

69

### 70 **2.3. Sample Preparation and Analysis**

71 Collected wastewater samples that were not filtered are denoted by the index O for original  
72 fraction. To analyse the solute fraction, aliquots of the sample were filtered; this fraction is  
73 denoted by the index F, using glass fiber pre-filters (Sartorius, Germany) over 0.45 μm filters  
74 (cellulose nitrate, Sartorius, Germany). COD<sub>O</sub> and COD<sub>F</sub>, the concentration of sulfate, total  
75 phosphor (PO<sub>4</sub>-P<sub>O</sub>) and phosphate (PO<sub>4</sub>-P<sub>F</sub>) were determined using cuvette tests (LCK Series,

76 Hach Lange, Germany) and a spectral photometer (Cadas 50, Hach Lange, Germany). Total  
77 Kjeldahl nitrogen (TKN as  $\text{NH}_4\text{-N}_\text{O}$ ) and ammonium ( $\text{NH}_4\text{-N}_\text{F}$ ) were measured using an  
78 ammonia selective electrode ( $\text{NH}_3$ -gas sensitive ion selective electrode, Metrohm, Germany).  
79 Here, for determination of TKN in the sample the nitrogen was converted to  $\text{NH}_4^+$  in  
80 concentrated sulfuric acid with  $\text{K}_2\text{SO}_4$  and  $\text{HgSO}_4$  added as catalysts in excess for the test  
81 range of 5 – 50 mg N  $\text{L}^{-1}$  in this modified potentiometric method (based on ISO 5663: 1984).

82 The acetate consumption was monitored using a HPLC system (Spectrasystem P4000,  
83 Thermo Fischer Scientific, USA) equipped with refractive index detector (Finnigan Surveyor  
84 RI Plus, Thermo Fischer Scientific, USA) and “HyperREZ XP Carbohydrate” column (H+8  
85  $\mu\text{m}$ , S/N: 026/H/012-227, Thermo Fischer Scientific, USA) using 0.005 N sulfuric acid at 0.5  
86  $\text{mL min}^{-1}$  as the eluent. Before injection the samples were filtered using 0.2  $\mu\text{m}$  filters  
87 (Phenex<sup>TM</sup>-RC membrane filters, Phenomenex, USA).

88 Coulomb efficiencies in this study refer to the amount of charge which passed through the  
89 anodes versus the theoretical amount of charged which could be gained by the amount of  
90 consumed acetate or COD, in synthetic wastewater or real wastewater experiments,  
91 respectively.

92

#### 93 **2.4. Electrochemical operation**

94 The electrochemical performance of the prototype was monitored using a potentiostat (SP-  
95 150, BioLogic, France), connected to a VMP3B amplifier (20 V/20 A), (BioLogic, France).  
96 For the laboratory wastewater screening a multi-channel potentiostat (MPG2, BioLogic,  
97 France) was used. All experiments were carried out using a three electrode setup using  
98 Ag/AgCl (sat. KCl) reference electrodes (0.197 V vs. SHE, Sensortechnik Meinsberg,  
99 Germany). The anode potential was adjusted to 0.2 V vs. Ag/AgCl. A single reference  
100 electrode was used in the laboratory experiments whereas two reference electrodes connected  
101 in series were used in the prototype (construction details see section 2.6). Total internal  
102 resistance is calculated by dividing the total cell voltage by the current.

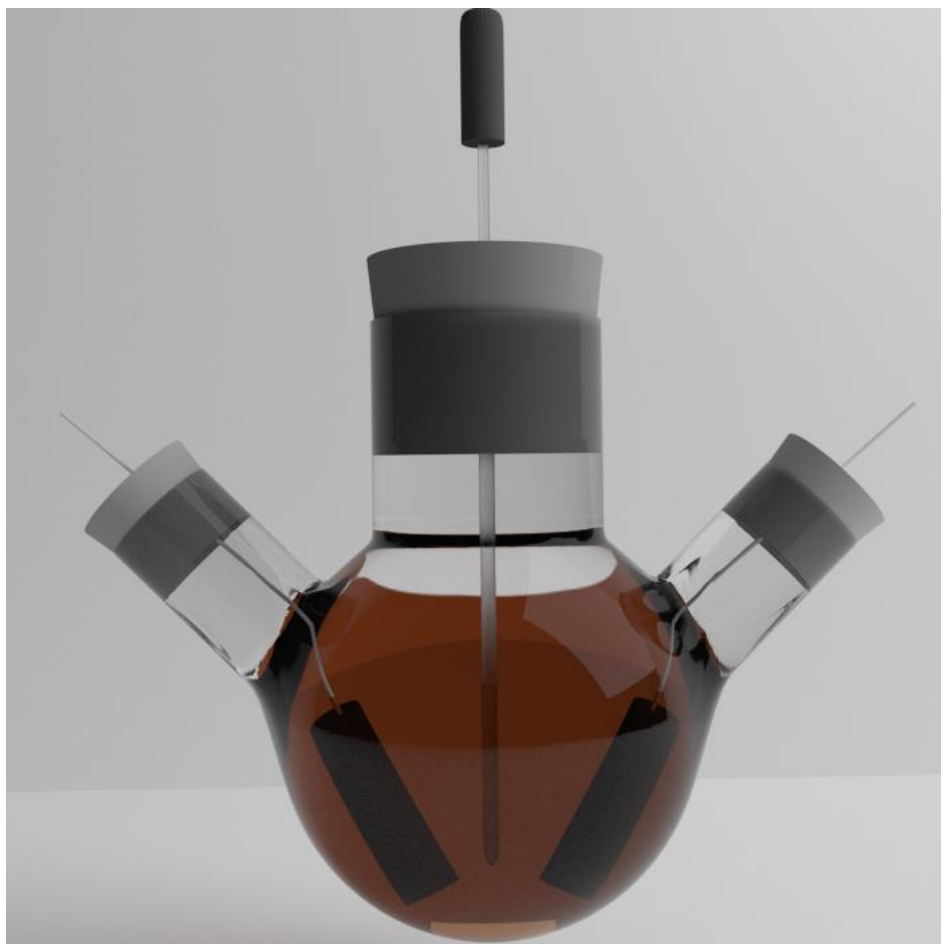
103

#### 104 **2.5. Laboratory setup and operation**

105 The laboratory wastewater tests were performed with EAPS using 200 mL of real wastewater  
106 in batch experiments run at 35 °C. The laboratory experiments were performed in 250 mL

107 round-bottom flasks as half-cells, as shown in Figure 2, using graphite rods (CP Graphite  
108 GmbH, Germany) with a total geometric surface area of  $13.35 \text{ cm}^2$  as the anode as well as the  
109 cathode and an Ag/AgCl reference electrode.

110

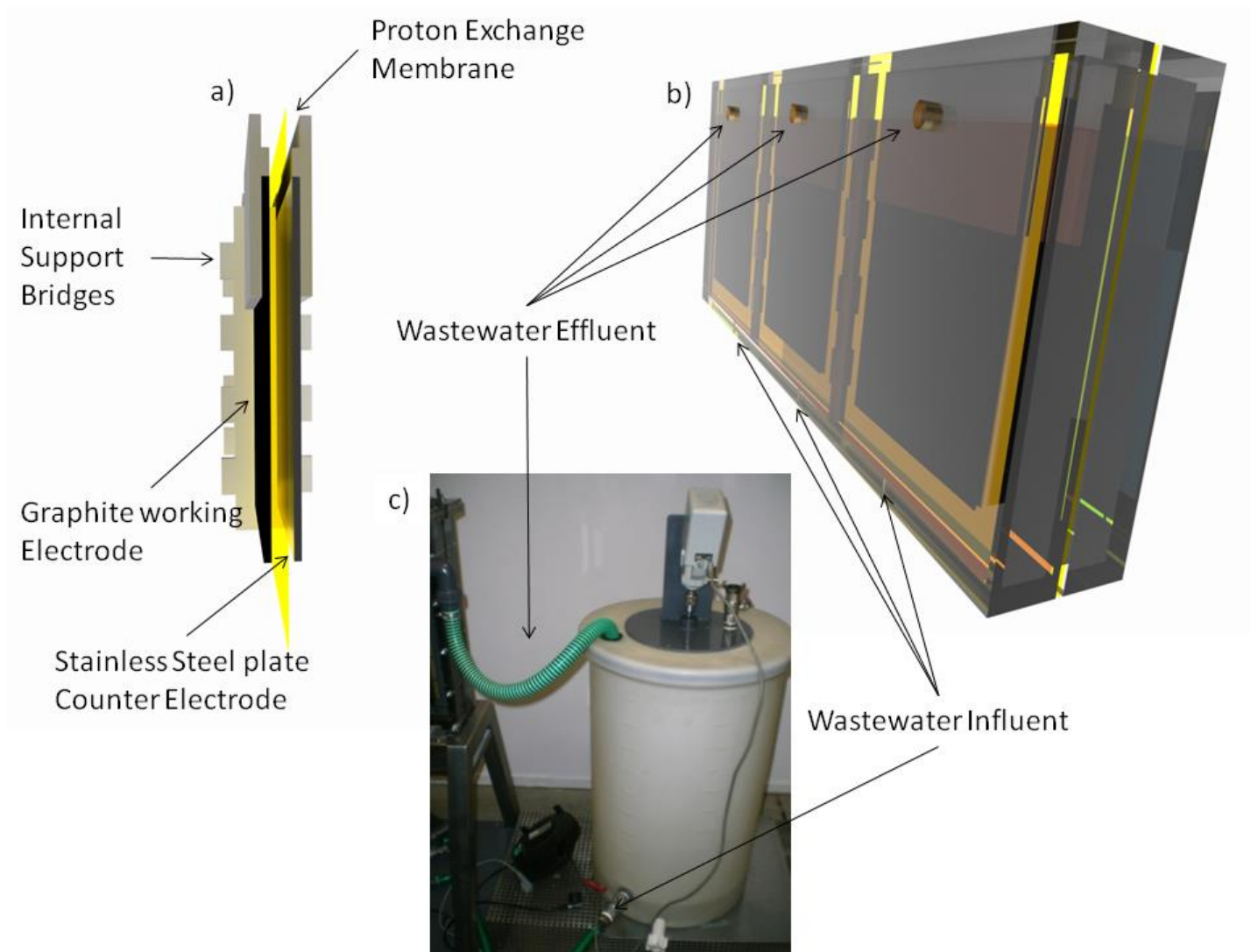


111 **Figure 2:** Depiction of the laboratory reactors used. All reactors were built from 250 mL  
112 round bottom flasks using a magnetic stirrer, Ag/AgCl-reference and, graphite rods as  
113 working and counter electrodes.  
114

115

## 116 **2.6. Prototype: Closed-loop setup and operation**

117 The prototype setup can be seen in Figure 3. The anode and cathode assembly with respect to  
118 the position of the proton exchange membrane (PEM) (fumapem® FKE-PP-75, fumatech  
119 GmbH, Germany) is shown in Figure 3a. The inner-facing side of anodes and cathodes were  
120 positioned at a distance of 7 mm from the PEM forming a two chamber microbial electrolysis  
121 cell (MEC). Figure 3b shows the prototype at the beginning of closed-loop batch trials with  
122 the storage tank (Figure 3c) from which recirculating wastewater was pumped between the  
123 storage tank and the reactor. All pumps, if not otherwise stated, were universal magnetically  
124 driven pumps (EHEIM GmbH & Co. KG, Germany). Graphite plates (CP Graphite GmbH,



125

126 **Figure 3:** Prototype setup for closed loop experiments: a) Working electrode, counter electrode and proton exchange membrane assembly; b) Full  
127 schematic representation; c) Storage tank with stirrer.

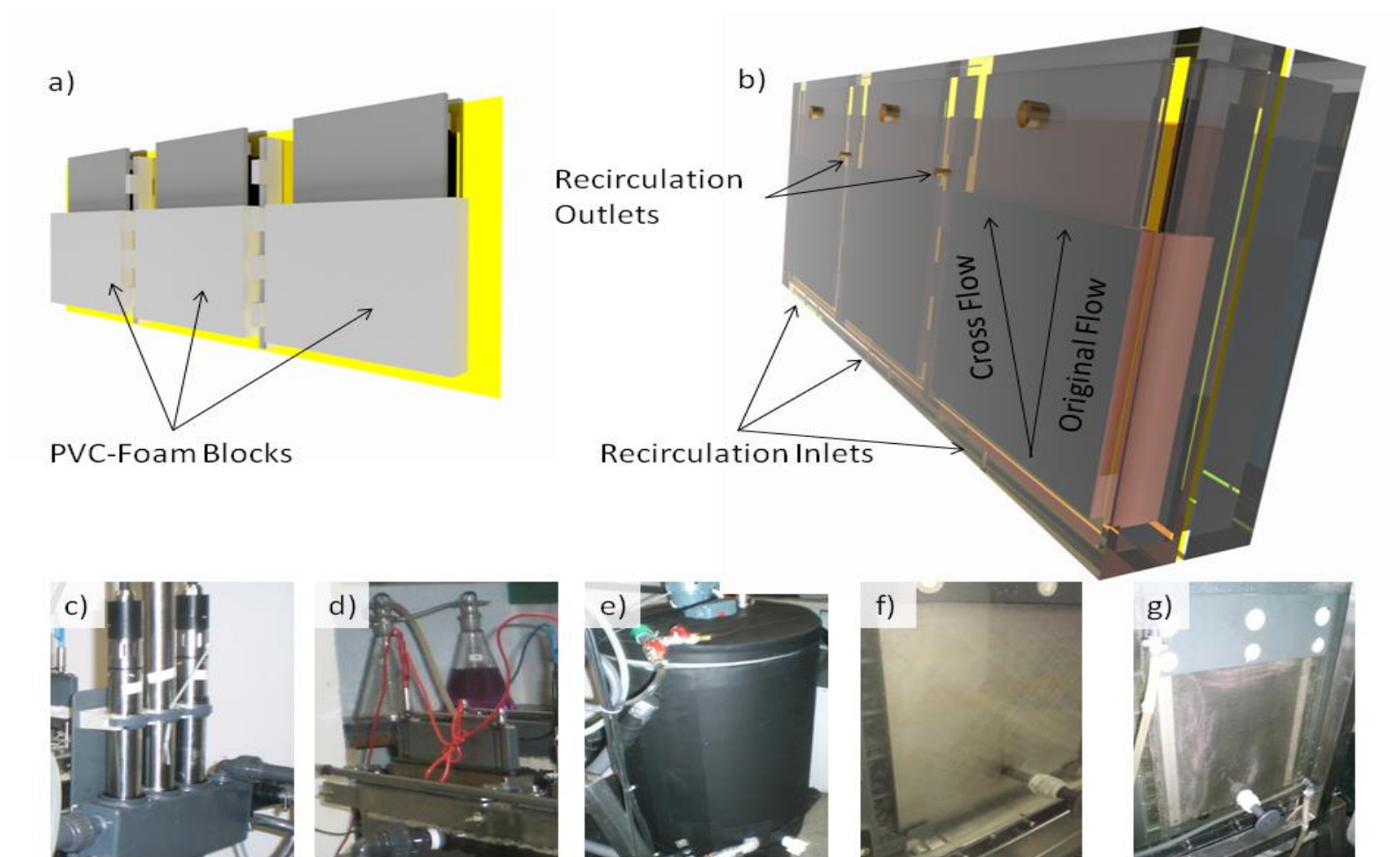
128 Germany) were used as anodes with a total geometric surface area of 5844 cm<sup>2</sup>, during  
129 synthetic wastewater experiments and 3896 cm<sup>2</sup> during real wastewater tests due to a  
130 technical defect in one of the three anode electrode adapters (~ current collectors). Stainless  
131 steel plates (V2A, Nettlenbusch & Syrowy Stahlhandelgesellschaft e.K, Germany) with a total  
132 geometric surface area of 5778 cm<sup>2</sup> served as cathodes and the surface areas was  
133 correspondingly reduced to 3852 cm<sup>2</sup> during real wastewater experiments. The cathode  
134 chamber was filled with 30 L of catholyte buffer solution (see section 2.2). Thereafter the  
135 prototype was operated in closed-loop batch where a total volume of 100 L of synthetic  
136 wastewater was circulated by a pump through the 30 L anode compartment at a flow rate of  
137 20 L min<sup>-1</sup>. The same mode of operation was used for the real wastewater tests. The prototype  
138 was operated at 25 ± 1 °C during this period of operation. Samples for analysis were taken  
139 from an outlet in the storage tank.

#### 140 **2.6.1. Prototype: Modifications for Continual Mode Operation**

141 The prototype was modified after dismantling and cleaning as follows, before switching to  
142 continuous mode operation (Figure 4). The first modifications were the addition of PVC foam  
143 plates to the anode chamber (Figure 4a) in order to reduce dead space. This also reduced the  
144 total anodes surface area to 994 cm<sup>2</sup>. Recirculation pumps were installed to improve mass  
145 transfer by improving the flow regime and further reducing the dead space to introduce a  
146 cross flow into the respective chamber (shown for the anode chamber, Figure 4b). Separate  
147 pumps were connected to the anode and cathode chambers. They were operated at 5 L min<sup>-1</sup>  
148 and 20 L min<sup>-1</sup>, respectively.

149 Additionally online sensors operated by an IQ Sensornet unit (Wissenschaftlich-Technische  
150 Werkstätten GmbH, Germany) were installed (Figure 4c, from left to right) for dissolved  
151 oxygen (TriOxmatic© 700), pH, temperature, (SensoLyt© 700), and conductivity (TetraCon©  
152 700) to measure the reactor effluent in close proximity to the reactor exit in a 500 mL  
153 recirculation unit run at 4.5 L min<sup>-1</sup>. Furthermore an ammonium trap (Figure 4d) was installed  
154 for collecting NH<sub>3</sub> in the off-gas of the cathode in sulfuric acid (1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> with thymol blue  
155 indicator) and a cooling/insulation sleeve (Figure 4e) around the storage tank was installed to  
156 prevent self-digestion of the wastewater. The cryostat was operated at 3 ± 1 °C resulting in a  
157 storage tank effluent temperature of 5 ± 1 °C. The final modification to the prototype, for the  
158 third phase of continuous mode operation, was to replace the stainless steel plate cathodes  
159 (Figure 4f) with cathodes made of 6 layers of stainless steel mesh (V2A, Ludwig Ohlendorf  
160 KG, Germany), Figure 4g, which had the same dimensions as the previous electrodes and





161

162 **Figure 4:** Modifications of the prototype setup carried out after closed-loop operation and before/during continual mode operation. They are: a)  
 163 PVC foam plates to decrease dead space in the anode chamber; b) Additional recirculation over an external pump to reduce dead space and improve  
 164 the flow regime by introducing a cross flow into the anode chamber; c) Online sensors, from left to right, for O<sub>2</sub> (aq), pH+ temperature and  
 165 conductivity; d) Cathode of gas ammonium trap (1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, thymol blue indicator); e) Cooling and insulation sleeve around the storage tank;  
 166 Replacement of stainless steel plate cathodes (f) with stainless steel mesh cathodes (g).

167 geometric surface area of  $1.65 \text{ m}^2$ , based on wire-frame calculations ( $d_{\text{wire}}$ : 0,2 mm, Open-  
168 space  $2,25 \text{ mm}^2$ ).

169 The dead space reduction, as described above, reduced the anode chamber volume from 30 L  
170 to 16 L. For continuous mode operation wastewater was pumped using an 8-head peristaltic  
171 pump (Watson Marlow, UK). In the first phase of continuous mode experiments EAPS was  
172 pumped through the anode chamber at  $9 \text{ mL min}^{-1}$  with a HRT of 1.23 d and an average COD  
173 loading rate of  $8.3 \pm 3.2 \text{ g O}_2 \text{ d}^{-1}$ . Initial biofilm growth occurred at a temperature of about  
174  $27 \text{ }^\circ\text{C}$  over a period of 25 days. Thereafter the operating temperature varied between  $25 \text{ }^\circ\text{C}$   
175 and  $36 \text{ }^\circ\text{C}$  due to local weather conditions. For the second phase of the continuous mode  
176 experiments ETP+Ac was pumped through the anode chamber at flow rates of 6, 9, 12, 15,  
177  $18 \text{ mL min}^{-1}$  resulting in hydraulic retention times (HRT) of 1.85, 1.23, 0.93, 0.74 and, 0.62 d,  
178 respectively, and  $\text{COD}_F$  loading rates between  $5 \text{ g O}_2 \text{ d}^{-1}$  and  $35 \text{ g O}_2 \text{ d}^{-1}$ .  
179

### 180 **3. Results and Discussion**

181 The main requirements of a wastewater treatment plant are that it is capable of removing from  
182 the wastewater influent chemical oxygen demand (COD), phosphor (in the form of phosphate)  
183 and nitrogen compounds, mainly ammonium and nitrate, at a minimum treatment efficiency  
184 stipulated in the relevant wastewater discharge regulations with a sustainable overhead. As  
185 mentioned, the treatment efficiency must be maintained for a wide range of loading rates and  
186 therefore BESs must achieve comparable treatment efficiency as the primary requirement for  
187 their potential application in wastewater treatment lines. Also the recovery and utilization of  
188 resources such as phosphorous and nitrogen is becoming an ever increasingly important  
189 economic factor in the sector of wastewater treatment and for the development of BES for  
190 wastewater treatment as well (Pant et al., 2011; Kelly and He, 2014).

191

#### 192 **3.1. Resource utilization and Recovery**

193 Total COD, i.e. in the unfiltered fraction, was removed on average at a rate of  
194  $0.08 \text{ g O}_2 \text{ d}^{-1} L_{\text{Anode}}^{-1}$  in closed-loop operation and at a rate of  $0.35 \text{ g O}_2 \text{ d}^{-1} L_{\text{Anode}}^{-1}$  in  
195 continuous mode operation. These results are comparable to COD removal rates reported for  
196 domestic wastewater of  $0.62 \text{ g O}_2 \text{ d}^{-1} L_{\text{Anode}}^{-1}$  (Ahn and Logan, 2013) and for primary effluent  
197  $0.90 \text{ g O}_2 \text{ d}^{-1} L_{\text{Anode}}^{-1}$  (Zhang et al., 2013) in continuous mode operation of BES, considering  
198 that simple graphite plates were used as the anodes in the prototype. Between closed loop and  
199 continuous mode operation the prototype achieved a removal efficiency for  $\text{COD}_O$  of 73 %

200 and for COD<sub>F</sub> of 60 % which are also comparable to COD<sub>F</sub> removal efficiencies of 62 % in  
201 larger scale MECs (Cusick et al., 2011).

202 As previously shown in a non-BES study (Bódalo et al., 2005) ammonium can be removed by  
203 an pH-/ion-gradient dependent removal over a osmosis membrane whereby the permeate must  
204 be constantly purged/stripped to maintain the concentration gradient in order to maintain a  
205 constant removal rate. While this was not implemented in this study the technical solution is  
206 readily available as has been shown and described in detail in other studies (Kuntke et al.,  
207 2011; Desloover et al., 2012; Kuntke et al., 2012) where synthetic urine, urine or sludge  
208 digestate were used as the substrate. These substrates had ammonium influent concentrations  
209 between 3 – 4 g N L<sup>-1</sup>. In this study we show that ammonium can be eliminated from EAPS  
210 with an initial concentration of around 70 mg N L<sup>-1</sup> which could be concentrated in the  
211 catholyte to concentrations of up to 3 g N L<sup>-1</sup> in closed-loop mode with an anolyte:catholyte  
212 volume ratio of 10:3 and that ammonium could be eliminated at an average rate of 285 ± 63  
213 mg N d<sup>-1</sup> in continuous mode until catholyte saturation vs. influent concentration, ~  
214 430:28 mg N L<sup>-1</sup>, was reached.

215 Phosphate elimination occurred in measurable amounts generally only at the beginning of the  
216 experimental phases. For example, during the first 8 days of operation in continuous mode  
217 using effluent after primary settling tank (EAPS) phosphate was eliminated at a rate of up to  
218 40 mg P d<sup>-1</sup>. After which, no significant elimination was observed and this indicates that the  
219 prototype reached a dynamic steady state i.e. the amount of biomass was sustained as opposed  
220 to a continuing increase in biomass. This was confirmed by measuring the total COD left  
221 remaining in the anode chamber, not including the electroactive biofilm, at the end of the  
222 continuous mode experiments. This measurement showed that the anode chamber contained  
223 less than 1 % of the total degraded COD, i.e. which remained as sludge in the reactor. This  
224 only single value is in accordance with the views presented in several life cycle assessment  
225 studies (Foley et al., 2010a; Foley et al., 2010b; Pant et al., 2011). There was, however, a  
226 clearly visible sedimentation of biomass which could have been formed due to anaerobic  
227 activity.

228

### 229 **3.2. The Prototypes Electrochemical Performance**

230 In addition to COD-removal a primary requirement of a BES is that it should utilize the  
231 inherent energy of the organic wastewater fraction at a sufficient efficiency, usually expressed  
232 in its (anodic) Coulomb efficiency and attained geometric current density. During closed-loop

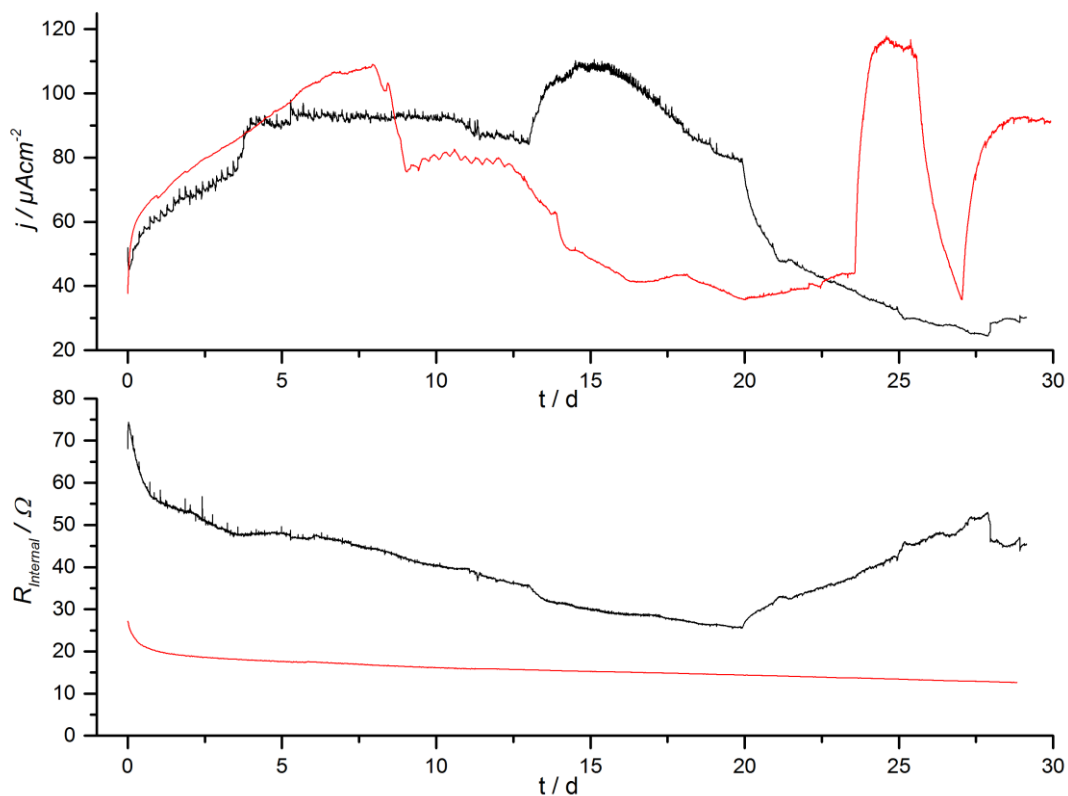
233 operation with synthetic wastewater the prototype achieved an average maximum current  
234 density ( $j_{max}$ ) of  $78 \mu\text{A cm}^{-2}$  and a Coulomb efficiency ( $CE$ ) of 27 % at a substrate utilization  
235 of 98 %. In continuous mode operation using treatment plant effluent spiked with acetate  
236 referring in this case to low or high loading rates with a factor 3 difference between them  
237 (TPE+Ac) about 90 % of the incoming substrate was utilized. Using TPE+Ac the prototype  
238 produced a  $j_{max}$  of  $55 - 109 \mu\text{A cm}^{-2}$  at a respective  $CE$  of 16 - 8 %. In comparison the  
239 prototype showed lower  $j_{max}$ ,  $36 \mu\text{A cm}^{-2}$ , and similar  $CE$  of 23 %, when operated with  
240 effluent after primary settling tank (EAPS). Here, in closed-loop mode a  $\text{COD}_O$  reduction of  
241 78 %, on average and 67 %  $\text{COD}_O$  reduction in continuous mode this entailed an average  $j_{max}$   
242 of  $72 \mu\text{A cm}^{-2}$  at a  $CE$  of 11 %. The current generation was lower using EAPS in continuous  
243 mode operation compared to  $232 \mu\text{A cm}^{-2}$  found in a  $3.3 L_{\text{Anode}}$  MEC operated with a 1:1  
244 mixture of brewery and anaerobic digester wastewater (Rabaey et al., 2010). However  
245 compared to a  $120 L_{\text{Anode}}$  MEC used to treat domestic wastewater in which a maximum  
246 current density of  $27 \mu\text{A cm}^{-2}$  was achieved (Rabaey et al., 2010; Heidrich et al., 2013) the  
247 prototype showed higher current generation. A point of interest, the prototype was also in the  
248 middle of both reactors in terms of anode compartment volume.

249 COD losses, i.e. COD which was unavailable to the electrochemically active bacteria (EAB)  
250 for current generation, occur due to side reactions with alternative terminal electron acceptors  
251 such as sulfate, nitrate and/or oxygen. Fermentations (resp. hydrolyses) and methanogenesis  
252 are also a possible cause for COD loss. In the experiments in continuous mode in which  
253 EAPS was treated, for example, nitrate was not found in significant concentrations ( $\ll 1$   
254 mM), residual oxygen was only present at a maximum of  $10 \mu\text{g O}_2 \text{ L}^{-1}$  and according to our  
255 calculations sulfate reduction was only responsible for 0.5 - 2 % of the COD reduction which  
256 leaves up to 80 % missing  $CE$ . The majority of the COD loss occurred most likely based on  
257 fermentative anaerobic activity and methanogenesis, which both increases with temperatures  
258 over  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  (Song et al., 2004), when wastewater with a biologically active matrix is treated.

259 An important component of all BESs is the cathode (Harnisch and Schröder, 2010) and  
260 specifically its contribution to the total resistance in the BES, both in terms of the material  
261 resistance but also in terms of the polarization resistance (Clauwaert et al., 2008). A higher  
262 resistance increases the external load required at the cathode to, for example, generate  
263 hydrogen in a MEC. Figure 5 shows the drastic decrease in total resistance which was  
264 achieved by replacing the stainless steel plate cathodes with stainless steel mesh cathodes,  
265 which have been shown to improve cathode performance for hydrogen production (Zhang et

266 al., 2010), in the prototype from two experiments in which EAPS was treated at the same flow  
 267 rate and otherwise under similar operating conditions for about 30 days. In essence because  
 268 both types of cathodes were made of V2A steel the resulting drop in total internal resistance  
 269 of the prototype from  $\text{Ø } 40 \pm 9 \text{ } \Omega$  using stainless steel plates to  $\text{Ø } 15 \pm 4 \text{ } \Omega$  using stainless  
 270 steel mesh over the experimental period means that the resistance reduction occurred by  
 271 increasing the geometric surface area of the cathode by a factor of 2.86 which is almost the  
 272 exact same difference in terms of the resistance reduction by a factor of 2.66. The overall  
 273 resistance of the system was more stable over the 30 days of operation when using the mesh  
 274 electrodes instead of the plate electrodes. This behavior was not caused by shifts in catholyte  
 275 or anolyte conductivity which both resulted in a resistance that fluctuated but remained under  
 276  $1.5 \text{ } \Omega$  for either solution.

277



278 **Figure 5:** Development of the current density (j), top, and total resistance(R), bottom, in  
 279 continuous mode operation with stainless steel plate (black trace) and mesh (red trace)  
 280 cathodes using effluent after primary settling tank as the substrate. The flow rate was kept  
 281 constant at  $9 \text{ mL}/\text{min}$  in both experiments at a temperature of  $25 - 30 \text{ } ^\circ\text{C}$ .  
 282  
 283

284

285 **3.3. Establishing a performance scale for prototype MEC**

286 In the following the results of the experiments carried out with the prototype will be compared  
287 with other existing systems to develop a general model to evaluate the performance of BES in  
288 general and that of the prototype specifically. This model will also be used to determine the  
289 effect on the prototype's performance after modifications were made before switching from  
290 closed loop to continuous mode operation.

291 The model assumes that the system under evaluation is in a dynamic steady state in which the  
292 microbial community is adapted to the incoming substrate and that microbial growth/death  
293 rates hold the balance so that the maximum amount of substrate is being utilized (Mudrack  
294 and Kunst, 1986). In this case a linearly increasing COD loading rate should result in a  
295 linearly increasing COD removal rate and in a constant removal efficiency. Therefore due to  
296 anodic respiration (Lovley D. R., 2006; Torres et al., 2010), in a BES this should ideally  
297 correlate to linearly increasing current density at a constant Coulomb efficiency. In the case of  
298 other parameters such as nitrogen removal the elimination paths are different but the final  
299 results can still be compared to one another.

300 The prototype's results will be compared to data from literature (Patil et al., 2010; Heidrich et  
301 al., 2013), laboratory experiments using EAPS and to the performance of the WWTP  
302 "Steinhof" using the same wastewater i.e. EAPS. The results obtained in this study are listed  
303 in

304 Table together with those from literature and data obtained from WWTP “Steinhof”. In the  
305 laboratory experiments using EAPS, 41 % of COD<sub>O</sub> was removed while achieving an average  
306 current density of 95 μA cm<sup>-2</sup> at a *CE* of 67 %. The large deviations in the prototype results in  
307 continuous mode using TPE+Ac are presumably due to the nature of the experiments which  
308 were performed, i.e. drastic shifts in flow rate and therefore HRT (see section 2.6.1 for  
309 details), in which the prototype was put through changes to test the systems stability while  
310 simulating real operating conditions.

311 In general, there are only a few differences in the operating conditions of selected  
312 bioelectrochemical systems (see Table 1). The pH values at the anode ranged from 6.5 – 7.5  
313 and the operating temperatures ranged from 25 – 35 °C across all BESs, with the exception of  
314 16.6 °C average temperature reported by (Heidrich et al., 2013). The HRT of the prototype in  
315 closed loop was significantly higher compared to the other systems and this discrepancy was  
316 corrected when operation was switched to continuous mode where the HRT was reduced to  
317 values closer to that of a real WWTP. The setups of the BES are similar in terms of their  
318 geometric anode surface area/reactor volume-ratio (A:V), with the exception of the A:V

319 **Table 1:** Comparison of the results of the laboratory and prototype experiments to treatment values obtained from the WWTP “Steinhof”,  
 320 Braunschweig Germany, for the month of October 2013 in which wastewater was also derived for the prototype experiments. Average values given  
 321 here with a standard deviation are based on at least triplicates. SWW: synthetic wastewater, EAPS: Effluent after primary settling tank; TPE+Ac:  
 322 Effluent treatment plant + Acetate; CL: Closed-loop; CM: Continuous mode; TKN: Total Kjeldahl Nitrogen.

|                                   |                    | A:V <sup>[1]</sup> /<br>cm <sup>2</sup> cm <sup>-3</sup> | ØHRT / d                 | pH        | T / °C        | Loading Rates   |   |   |  | Removal Efficiency    |                       |                                   |          | Ø <sub>jmax</sub> /<br>µA cm <sup>-2</sup> | ØCE / %           |
|-----------------------------------|--------------------|--|--------------------------|-----------|---------------|---|---|---|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------------------|----------|--|-------------------|
|                                   |                    |  |                          |           |               | COD <sub>O</sub> / g O <sub>2</sub><br>d <sup>-1</sup> L <sub>Reactor</sub> <sup>-1</sup> | COD <sub>F</sub> / g O <sub>2</sub><br>d <sup>-1</sup> L <sub>Reactor</sub> <sup>-1</sup> | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> / mg N<br>d <sup>-1</sup> L <sub>Reactor</sub> <sup>-1</sup> | TKN / mg N<br>d <sup>-1</sup> L <sub>Reactor</sub> <sup>-1</sup> | ΔCOD <sub>O</sub> / % | ΔCOD <sub>F</sub> / % | ΔNH <sub>4</sub> <sup>+</sup> / % | ΔTKN / % |  |                   |
| <b>Patil et al., 2010</b>         |                    | 0.04   | 0.3                      | 6.8/7     | 25/32<br>[2]  |   | 4.3   |   |  | -                     | 100                   | -                                 | -        | 400/627                                    | 80                |
| <b>Lab scale- EAPS</b>            |                    | 0.07   | 8 ± 1.6                  | 7.2       | 35            | 0.06  |   |   |  | 41                    | -                     | -                                 | -        | 95 ± 44                                    | 67                |
| <b>Prototype -<br/>CL</b>         | <b>SWW</b>         | 0.06   | 16 ± 8                   | 7         | 25            |   | 0.3   |   |  | -                     | 98 ± 2                | -                                 | -        | 78 ± 28                                    | 27 ± 11           |
|                                   | <b>EAPT</b>        | 0.04   | 24 ± 7                   | 6.8 ± 0.3 | 25            | 0.11 ± 0.03   | 0.08 ± 0.02   | 9.5 ± 1.3   | 11 ± 1.1   | 78 ± 9                | 75 ± 11               | 72 ± 15                           | 69 ± 14  | 36 ± 8                                     | 23 ± 9            |
| <b>Prototype -<br/>CM</b>         | <b>EAPT</b>        | 0.06   | 1.23                     | 6.5 ± 0.2 | 31 ± 1        | 0.54 ± 0.21   | 0.19 ± 0.09   | 35 ± 13   | 50 ± 16  | 67 ± 8                | 45 ± 7                | 40 ± 7                            | 45 ± 9   | 72 ± 27                                    | 11 ± 3            |
|                                   | <b>TPE-<br/>Ac</b> | 0.06   | 1.6 ± 0.3 /<br>0.6 ± 0.1 | 7.5 ± 0.2 | 32 ± 2        |   | 0.6 ± 0.06 /<br>1.7 ± 0.19  |   |  | -                     | 90 ± 3 /<br>88 ± 1    | -                                 | -        | 55 ± 11 /<br>109 ± 33                      | 16 ± 9 /<br>8 ± 1 |
| <b>Heidrich et al., 2012</b>      |                    | 1.64   | 1.0                      | 6.7       | 16.6 ±<br>1.2 | 0.14  |   |   |  | 34 ± 54               |                       |                                   |          | 27   | 27                |
| <b>WWTP “Steinhof” -<br/>EAPS</b> |                    | -  | 1.1 ± 0.2                | -         | -             | 0.66 ± 0.04   | 0.44 ± 0.1  | 39 ± 6  | 57 ± 11  | 95 ± 1                | 93 ± 2                | 89 ± 4                            | 85 ± 4   | -  | -                 |

323 [1] Geometric surface area-Anode/Reactor Volume-ratio (A:V) was calculated using the total liquid reactor volume: Laboratory 200 mL & Prototype-CL 30 L/-CM 16 L.

324 [2] Operating temperatures, respective growth temperatures where 25/27 °C.



325 difference of 1.75 between the laboratory EAPS reactor setup and the prototype (CL) EAPS  
326 setup which was reduced to 1.16 in the prototype (CM) setup. Also the 120 L MEC from  
327 (Heidrich et al., 2013) has a much higher A:V of 1.64.

328 The model is still in development and is introduced here as a possible future tool and must  
329 still be improved upon. The result is an overall performance factor (*PF*) that should provide  
330 insight into the reasons for differences in performance from one system to another. The  
331 mathematical method for combining data for evaluation is based on Gaussian error  
332 propagation. This was chosen because it allows the combination of independent variables to  
333 total factors. Here, the performance factor expresses the relative difference in treatment  
334 efficiency, both removal and energetic, balanced against the loading rates which are given for  
335 the systems in question. The performance factor (*PF*) is calculated by combining the loading  
336 rate factor (*LRF*) and the treatment efficiency factor (*TEF*) in the same way as the variable-  
337 pair factors are combined using equation (3). Variable-pair factors are denoted in the  
338 equations by  $\Delta(X_i, \dots, X_{i+1})$  and *LRF*, *TEF* and *PF* are denoted by  $\Delta y$ .

339 Loading rates for  $COD_{O, F}$ , ammonium and total Kjeldahl nitrogen (*TKN*) were used to  
340 calculate the *LRF*.  $\Delta COD_{O, F}$ ,  $\Delta NH_4^+$  and  $\Delta TKN$  are calculated using equation (1) and together  
341 with  $j_{max}$  and *CE* were used to calculate the *TEF*. The data for the calculations is listed in

342 Table .  $\Delta(X_i, \dots, X_{i+1})$  is calculated using equation (2) for individual pairs of variables which  
 343 in turn are used to calculate  $\Delta y$  with equation (3). The relevance factor ( $\lambda$ ) for  $\Delta COD_F$ , with  
 344 synthetic wastewater, was valued at 0.5 because it is not as significant a factor as  $j_{max}$  or  $CE$   
 345 and in all other cases  $\lambda$  was 1. TEF is then corrected using equation (2) so that in the case of  
 346 standard vs. standard the PF equals 1, i.e. the resulting PF can be viewed as a factor greater or  
 347 lower than 1, the same as PFs resulting from TEFs calculated with a  $\lambda$  of 1. The results of  
 348 these calculations are listed in Table .

$$349 \quad \Delta c = \frac{c_{Influent} - c_{Effluent}}{c_{Influent}} \times 100 \% \quad (1)$$

350 c: Compound concentration or load

351

$$352 \quad \Delta(x_i, \dots, x_{i+1}) = \frac{\lambda}{(x_i, \dots, x_{i+1})_{Standard}} \times (x_i, \dots, x_{i+1})_{Prototype} \quad (2)$$

353  $x_i, \dots, x_{i+1}$ : Variable pairs for the standard and prototype listed in Table 1, as explained above;  $\lambda$ : Relevance  
 354 Factor, in this case 1 or 0.5.

355 **Table 2:** Comparison of the performance of the prototype, in both closed-loop (CL) and continuous mode (CM), against laboratory systems using  
 356 synthetic wastewater (SWW) or effluent treatment plant spiked with acetate (TPE+Ac), the WWTP “Steinhof” (KWS) with effluent after primary  
 357 settling tank (EAPS) as the substrate. Loading rate factors, treatment efficiency factors and the prototypes performance factor were calculated using  
 358 Equation (2).

|  | Prototype vs. Standard                                  | Loading Rate Factor | Treatment efficiency Factor <sup>[1]</sup> | Performance Factor <sup>[2]</sup> |
|--|---|---------------------|--|-----------------------------------|
| Synthetic wastewater or Effluent Treatment Plant + Acetate | Prototype (CL) vs. Patil et al., 2010                   | 0.06                | 0.42                                       | 0.30                              |
|  | Prototype (CM <sub>1.6 d</sub> ) vs. Patil et al., 2010 | 0.13                | 0.33                                       | 0.25                              |
|  | Prototype (CM <sub>0.6 d</sub> ) vs. Patil et al., 2010 | 0.40                | 0.32                                       | 0.36                              |
|  | Prototype (CM <sub>1.6 d</sub> ) vs. Prototype (CL)     | 2.13                | 0.69                                       | 1.58                              |
|  | Prototype (CM <sub>0.6 d</sub> ) vs. Prototype (CL)     | 6.35                | 1.00                                       | 4.55                              |
| Effluent after primary settling tank                       | Prototype (CL) vs. Laboratory                           | 1.82                | 1.14                                       | 1.52                              |
|  | Prototype (CM) vs. Laboratory                           | 8.65                | 1.04                                       | 6.16                              |
|  | Prototype (CL) vs. WWTP                                 | 0.20                | 0.81                                       | 0.59                              |
|  | Prototype (CM) vs. WWTP                                 | 0.91                | 0.55                                       | 0.75                              |
|  | Prototype (CM) vs. Prototype (CL)                       | 2.39                | 0.91                                       | 1.81                              |
| Prototype (CM, 1.2 d) vs. Heidrich et al., 2012            |   | 3,86                | 1,96                                       | 3.05                              |

359 [1]  $\lambda$  was set as 0.5 for  $\Delta COD_F$  for synthetic wastewater and in the case of standard vs. standard the treatment efficiency factor would have a value of 0.87 therefore TEF is  
 360 corrected using equation (2) so that the performance factor of standard vs. standard would have a value of 1. [2] Factors refer to how, in this case, the prototype performed  
 361 measured against the “standard” i.e. factors lower than 1 indicates that the prototype performed worse than the standard and factors higher than 1 indicate a better  
 362 performance.

$$\Delta y = \sqrt{\frac{\sum (\Delta x_i)^2 + \dots + (\Delta x_{i+1})^2}{N}} \quad (3)$$

364  $\Delta(X_i, \dots, X_{i+1})$  as calculated from equation (1) or are the loading rate or treatment efficiency factor; N is the  
 365 number of variables in each comparison i.e.  $i+1$ ;  $\Delta y$  is either the loading rate, treatment efficiency or  
 366 performance factor.

367

368 The first half of Table 2 shows the performance factors of the prototype in closed-loop (CL)  
 369 or continuous mode (CM) compared to experiments using synthetic wastewater (SWW) (Patil  
 370 et al., 2010). The prototype's performance factor was determined to be; CL: 0.30,  $CM_{1.6 \text{ d}}$ :  
 371 0.25 and,  $CM_{0.6 \text{ d}}$ : 0.36. The prototype's performance decreased by 5 % from CL to  $CM_{1.6 \text{ d}}$ ,  
 372 and increased by 9 % in  $CM_{0.6 \text{ d}}$  compared to Patil et al. Comparing CL to CM we obtained a  
 373 performance increase from 1.58 at an  $\emptyset$ HRT of 1.6 d, to 4.55 at an  $\emptyset$ HRT of 0.6 d. This is  
 374 due to sustained treatment efficiency at increasing loading rates, i.e. while the loading rate  
 375 was increased significantly; the loss of energetic efficiency is in comparison significantly  
 376 lower.

377 The performance factor of the prototype using EAPS operated in CL and CM is shown in the  
 378 second half of Table 2. In comparison to the laboratory BES, the prototype achieved a  
 379 performance factor of 1.52 and 6.16 for CL and CM, respectively. The prototype showed a  
 380 performance factor of 0.59, CL, and 0.75, CM, when compared to the loading rate and  
 381 treatment efficiency of the activated sludge tank of the WWTP "Steinhof". Performance  
 382 factor in continuous mode was 16 % higher than in closed loop compared to the WWTP. The  
 383 prototype's increase in performance factor from CL to CM compared to the WWTP, as was  
 384 observed when using synthetic wastewater, results from increasing loading rate while the  
 385 treatment efficiency was maintained. Compared to a 120 L MEC (Heidrich et al., 2013) the  
 386 prototype showed an overall performance factor of 3.05 this relatively high difference  
 387 between the systems is partly caused by the difference in operating temperatures which was  
 388 about twice as high during the prototype experiments with EAPS in continuous mode. Also  
 389 the specific organic composition of the wastewater was most likely different which can also  
 390 be a limiting factor for BES performance (Pant et al., 2010) partly reflected in the lower  
 391  $COD_O$  loading rate.

392 The prototype's overall performance was increased by the modifications made from  
 393 closed loop to continuous mode operation. This is shown by the performance factor  
 394 comparison between the operating modes where in continuous mode the prototypes  
 395 performance increased although the HRT was reduced and the loading rate was increased in

396 both trials using synthetic wastewater and real wastewater. This also shows the importance of  
397 reactor design and internal architecture, whereas most studies focus on improving  
398 performance purely by improving (anode) electrode performance.

399 To further improve modeling and understanding of bioelectrochemical systems a solid  
400 fundament of comparable and connectable data is required and therefore increased  
401 standardization of published results, as has been suggested in several reviews (Harnisch and  
402 Rabaey, 2012; Logan, 2012; Sharma et al., 2014), would greatly help. This would also allow a  
403 mathematical approach to performance evaluation to be fully developed with increased  
404 precision because of an increasing number of parameters which are taken into account.

405

#### 406 **4. Conclusions**

407 In this study we presented a technical scale microbial electrolysis cell (MEC), the  
408 “prototype”, and investigated its performance, especially in terms of COD-removal and the  
409 utilization of COD for current generation, using both synthetic and real wastewater. When  
410 comparing the achieved performance to laboratory scale experiments, as well as to other  
411 larger MECs and to the treatment performance of a real wastewater treatment plant, the  
412 prototype demonstrated clearly its potential of providing a significant contribution to a more  
413 energy efficient wastewater treatment. Furthermore, pH-/ion-gradient dependent ammonium  
414 removal from the wastewater was utilized and further promoted by increasing EAB activity.  
415 The concentrated ammonium can easily be stripped from the catholyte solution in a side  
416 process.

417 The relatively simple design of the prototype can easily be improved further, e.g. by using  
418 3D-electrodes such as layered corrugated (Chen et al., 2012) or graphite fiber brush electrodes  
419 (Logan et al., 2007; Feng et al., 2010; Liu et al., 2013). Improved anodes in combination with  
420 further dead space reduction and flow regime optimization, which are equally important to the  
421 success of BES in treating wastewater, will allow microbial biotechnological solutions for  
422 treating wastewater to be competitive compared to existing treatment systems.

423 After treating EAPS with the prototype effluent COD concentrations of  $210 \pm 78 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$   
424 were achieved with a corresponding removal efficiency of  $67 \pm 8 \%$ . With the above  
425 mentioned improvements the prototypes treatment performance has to be increased in future  
426 up to and above the minimum standards stipulated in wastewater regulations, e.g. minimum

427 75 % COD removal according to the European Urban Wastewater Directive, and thereby also  
428 increasing the energetic performance.

429 A major factor for the future success of bioelectrochemical systems will be maintaining a high  
430 performance at low HRT, i.e. an average HRT in the range of real WWTPs of approx. 1 d or  
431 less. As shown in this study, the optimization of the surface to volume ratio of the anode, i.e.  
432 reducing the dead space and improving flow regime with recirculation has a significant  
433 impact on the performance of a BES. We also demonstrated that establishing a performance  
434 factor for a BES can be done in a comprehensive comparison of BES and non-BES systems,  
435 e.g. aerobic treatment systems which are the main treatment system for domestic wastewater.  
436 The approach can be used to quantify the effects of system modifications which are otherwise  
437 vague and should also allow for a more precise evaluation of future BES designs of different  
438 sizes and utilizing different substrates.

439

## 440 **5. Acknowledgements**

441 The authors gratefully thank the German Federal Environmental Foundation (Deutsche  
442 Bundesstiftung Umwelt) for supporting this project (DBU Grant: AZ 30194-31). We would  
443 also like to thank in particular Michael Aspeleiter, Erdmuthe Oberberg, Sebastian Riedl and  
444 André Baudler for their assistance in technical operations and routine analysis, and to  
445 Waldemar Sauter for the 3D-graphic schematics.

446

## 447 **6. References**

- 448 Ahn, Y., Logan, B.E., 2013. Domestic wastewater treatment using multi-electrode continuous  
449 flow MFCs with a separator electrode assembly design. *Appl Microbiol Biotechnol* 97 (1),  
450 409–416. 10.1007/s00253-012-4455-8.
- 451 Balch, W.E., Fox, G.E., Magrum, L.J., Woese, C.R., Wolfe, R.S., 1979. Methanogens:  
452 reevaluation of a unique biological group. *Microbiological Reviews* 43 (2), 260–296.
- 453 Bódalo, A., Gómez, J.-L., Gómez, E., León, G., Tejera, M., 2005. Ammonium removal from  
454 aqueous solutions by reverse osmosis using cellulose acetate membranes. *Desalination*  
455 184 (1-3), 149–155. 10.1016/j.desal.2005.03.062.
- 456 Chen, S., He, G., Liu, Q., Harnisch, F., Zhou, Y., Chen, Y., Hanif, M., Wang, S., Peng, X.,  
457 Hou, H., Schröder, U., 2012. Layered corrugated electrode macrostructures boost  
458 microbial bioelectrocatalysis. *Energy Environ. Sci.* 5 (12), 9769. 10.1039/c2ee23344d.
- 459 Chen, S., Hou, H., Harnisch, F., Patil, S.A., Carmona-Martinez, A.A., Agarwal, S., Zhang, Y.,  
460 Sinha-Ray, S., Yarin, A.L., Greiner, A., Schröder, U., 2011. Electrospun and solution  
461 blown three-dimensional carbon fiber nonwovens for application as electrodes in  
462 microbial fuel cells. *Energy Environ. Sci.* 4 (4), 1417. 10.1039/c0ee00446d.

463 Cheng, S., Logan, B.E., 2011. Increasing power generation for scaling up single-chamber air  
464 cathode microbial fuel cells. *Bioresource Technology* 102 (6), 4468–4473.  
465 10.1016/j.biortech.2010.12.104.

466 Clauwaert, P., Aelterman, P., Pham, T.H., Schampelaire, L., Carballa, M., Rabaey, K.,  
467 Verstraete, W., 2008. Minimizing losses in bio-electrochemical systems: the road to  
468 applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 79 (6), 901–913. 10.1007/s00253-008-1522-2.

469 Cusick, R.D., Bryan, B., Parker, D.S., Merrill, M.D., Mehanna, M., Kiely, P.D., Liu, G.,  
470 Logan, B.E., 2011. Performance of a pilot-scale continuous flow microbial electrolysis  
471 cell fed winery wastewater. *Appl Microbiol Biotechnol* 89 (6), 2053–2063.  
472 10.1007/s00253-011-3130-9.

473 Desloover, J., Abate Woldeyohannis, A., Verstraete, W., Boon, N., Rabaey, K., 2012.  
474 Electrochemical Resource Recovery from Digestate to Prevent Ammonia Toxicity during  
475 Anaerobic Digestion. *Environ. Sci. Technol.* 46 (21), 12209–12216. 10.1021/es3028154.

476 Feng, Y., Yang, Q., Wang, X., Logan, B.E., 2010. Treatment of carbon fiber brush anodes for  
477 improving power generation in air–cathode microbial fuel cells. *Journal of Power Sources*  
478 195 (7), 1841–1844. 10.1016/j.jpowsour.2009.10.030.

479 Foley, J.M., Rozendal, R.A., Hertle, C.K., Lant, P.A., Rabaey, K., 2010a. Life Cycle  
480 Assessment of High-Rate Anaerobic Treatment, Microbial Fuel Cells, and Microbial  
481 Electrolysis Cells. *Environ. Sci. Technol.* 44 (9), 3629–3637. 10.1021/es100125h.

482 Foley, J.M., Haas, D. de, Hartley, K., Lant, P., 2010b. Comprehensive life cycle inventories  
483 of alternative wastewater treatment systems. *Water Research* 44 (5), 1654–1666.  
484 10.1016/j.watres.2009.11.031.

485 Harnisch, F., Rabaey, K., 2012. The Diversity of Techniques to Study Electrochemically  
486 Active Biofilms Highlights the Need for Standardization. *ChemSusChem* 5 (6), 1027–  
487 1038. 10.1002/cssc.201100817.

488 Harnisch, F., Schröder, U., Scholz, F., 2008. The Suitability of Monopolar and Bipolar Ion  
489 Exchange Membranes as Separators for Biological Fuel Cells. *Environ. Sci. Technol.* 42  
490 (5), 1740–1746. 10.1021/es702224a.

491 Harnisch, F., Schröder, U., 2010. From MFC to MXC: chemical and biological cathodes and  
492 their potential for microbial bioelectrochemical systems. *Chem. Soc. Rev.* 39 (11), 4433.  
493 10.1039/c003068f.

494 Heidrich, E.S., Dolfing, J., Scott, K., Edwards, S.R., Jones, C., Curtis, T.P., 2013. Production  
495 of hydrogen from domestic wastewater in a pilot-scale microbial electrolysis cell. *Appl*  
496 *Microbiol Biotechnol* 97 (15), 6979–6989. 10.1007/s00253-012-4456-7.

497 Kelly, P.T., He, Z., 2014. Nutrients removal and recovery in bioelectrochemical systems: A  
498 review. *Bioresource Technology* 153, 351–360. 10.1016/j.biortech.2013.12.046.

499 Kim, D., An, J., Kim, B., Jang, J.K., Kim, B.H., Chang, I.S., 2012. Scaling-Up Microbial Fuel  
500 Cells: Configuration and Potential Drop Phenomenon at Series Connection of Unit Cells  
501 in Shared Anolyte. *ChemSusChem* 5 (6), 1086–1091. 10.1002/cssc.201100678.

502 Kim, J.R., Min, B., Logan, B.E., 2005. Evaluation of procedures to acclimate a microbial fuel  
503 cell for electricity production. *Appl Microbiol Biotechnol* 68 (1), 23–30. 10.1007/s00253-  
504 004-1845-6.

505 Kuntke, P., Geleji, M., Bruning, H., Zeeman, G., Hamelers, H., Buisman, C., 2011. Effects of  
506 ammonium concentration and charge exchange on ammonium recovery from high strength  
507 wastewater using a microbial fuel cell. *Bioresource Technology* 102 (6), 4376–4382.  
508 10.1016/j.biortech.2010.12.085.

509 Kuntke, P., Śmiech, K.M., Bruning, H., Zeeman, G., Saakes, M., Sleutels, T.H.J.A.,  
510 Hamelers, H.V.M., Buisman, C.J.N., 2012. Ammonium recovery and energy production  
511 from urine by a microbial fuel cell. *Water Research* 46 (8), 2627–2636.  
512 10.1016/j.watres.2012.02.025.

513 Liu, C., Li, J., Zhu, X., Zhang, L., Ye, D., Brown, R.K., Liao, Q., 2013. Effects of brush  
514 lengths and fiber loadings on the performance of microbial fuel cells using graphite fiber  
515 brush anodes. *International Journal of Hydrogen Energy* 38 (35), 15646–15652.  
516 10.1016/j.ijhydene.2013.03.144.

517 Logan, B., Cheng, S., Watson, V., Estadt, G., 2007. Graphite Fiber Brush Anodes for  
518 Increased Power Production in Air-Cathode Microbial Fuel Cells. *Environ. Sci. Technol.*  
519 41 (9), 3341–3346. 10.1021/es062644y.

520 Logan, B.E., 2010. Scaling up microbial fuel cells and other bioelectrochemical systems.  
521 *Appl Microbiol Biotechnol* 85 (6), 1665–1671. 10.1007/s00253-009-2378-9.

522 Logan, B.E., 2012. Essential Data and Techniques for Conducting Microbial Fuel Cell and  
523 other Types of Bioelectrochemical System Experiments. *ChemSusChem* 5 (6), 988–994.  
524 10.1002/cssc.201100604.

525 Lovley D. R., 2006. Bug juice. harvesting electricity with microorganisms. *Nat. Rev.*  
526 *Microbiol.* (4), 497–508.

527 Mudrack, K., Kunst, S., 1986. *Biology of sewage treatment and water pollution control*. E.  
528 Horwood; Halsted Press, Chichester [West Sussex], New York, viii, 193.

529 Oliveira, V.B., Simões, M., Melo, L.F., Pinto, A., 2013. Overview on the developments of  
530 microbial fuel cells. *Biochemical Engineering Journal* 73, 53–64.  
531 10.1016/j.bej.2013.01.012.

532 Pant, D., Singh, A., van Bogaert, G., Gallego, Y.A., Diels, L., Vanbroekhoven, K., 2011. An  
533 introduction to the life cycle assessment (LCA) of bioelectrochemical systems (BES) for  
534 sustainable energy and product generation: Relevance and key aspects. *Renewable and*  
535 *Sustainable Energy Reviews* 15 (2), 1305–1313. 10.1016/j.rser.2010.10.005.

536 Pant, D., van Bogaert, G., Diels, L., Vanbroekhoven, K., 2010. A review of the substrates  
537 used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production. *Bioresource*  
538 *Technology* 101 (6), 1533–1543. 10.1016/j.biortech.2009.10.017.

539 Patil, S.A., Harnisch, F., Kapadnis, B., Schröder, U., 2010. Electroactive mixed culture  
540 biofilms in microbial bioelectrochemical systems: The role of temperature for biofilm  
541 formation and performance. *Biosensors and Bioelectronics* 26 (2), 803–808.  
542 10.1016/j.bios.2010.06.019.

543 Patil, S.A., Harnisch, F., Koch, C., Hübschmann, T., Fetzer, I., Carmona-Martínez, A.A.,  
544 Müller, S., Schröder, U., 2011. Electroactive mixed culture derived biofilms in microbial  
545 bioelectrochemical systems: The role of pH on biofilm formation, performance and  
546 composition. *Bioresource Technology* 102 (20), 9683–9690.  
547 10.1016/j.biortech.2011.07.087.

548 Rabaey, K., Bützer, S., Brown, S., Keller, J., Rozendal, R.A., 2010. High Current Generation  
549 Coupled to Caustic Production Using a Lamellar Bioelectrochemical System. *Environ.*  
550 *Sci. Technol.* 44 (11), 4315–4321. 10.1021/es9037963.

551 Schröder, U., Nießen, J., Scholz, F., 2003. *Angew. Chem.* 115 (25), 2986–2989.  
552 10.1002/ange.200350918.

553 Schröder, U., 2011. Discover the possibilities: microbial bioelectrochemical systems and the  
554 revival of a 100-year-old discovery. *J Solid State Electrochem* 15 (7-8), 1481–1486.  
555 10.1007/s10008-011-1395-7.

556 Sharma, M., Bajracharya, S., Gildemyn, S., Patil, S.A., Alvarez-Gallego, Y., Pant, D.,  
557 Rabaey, K., Dominguez-Benetton, X., 2014. A critical revisit of the key parameters used  
558 to describe microbial electrochemical systems. *Electrochimica Acta*.  
559 10.1016/j.electacta.2014.02.111.

560 Sleutels, T.H.J.A., Darus, L., Hamelers, H.V.M., Buisman, C.J.N., 2011. Effect of operational  
561 parameters on Coulombic efficiency in bioelectrochemical systems. *Bioresource*  
562 *Technology* 102 (24), 11172–11176. 10.1016/j.biortech.2011.09.078.



563 Song, Y.-C., Kwon, S.-J., Woo, J.-H., 2004. Mesophilic and thermophilic temperature co-  
564 phase anaerobic digestion compared with single-stage mesophilic- and thermophilic  
565 digestion of sewage sludge. *Water Research* 38 (7), 1653–1662.  
566 10.1016/j.watres.2003.12.019.

567 Torres, C.I., Marcus, A.K., Lee, H.-S., Parameswaran, P., Krajmalnik-Brown, R., Rittmann,  
568 B.E., 2010. A kinetic perspective on extracellular electron transfer by anode-respiring  
569 bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 34 (1), 3–17. 10.1111/j.1574-6976.2009.00191.x.

570 Zhang, F., Ge, Z., Grimaud, J., Hurst, J., He, Z., 2013. Long-Term Performance of Liter-Scale  
571 Microbial Fuel Cells Treating Primary Effluent Installed in a Municipal Wastewater  
572 Treatment Facility. *Environ. Sci. Technol.* 47 (9), 4941–4948. 10.1021/es400631r.

573 Zhang, Y., Merrill, M.D., Logan, B.E., 2010. The use and optimization of stainless steel mesh  
574 cathodes in microbial electrolysis cells. *International Journal of Hydrogen Energy* 35 (21),  
575 12020–12028. 10.1016/j.ijhydene.2010.08.064.

576



## University Duisburg – Essen

Department of Chemistry

Curriculum "M. Sc. Water Science"

Master Thesis:

# **MICROBIAL FUEL CELLS: DEVELOPEMENT TO PROTOTYPE STATUS**

for attainment of the academic degree of

## **Master of Science**

Presented by:

**Robert Keith Brown**

ES0 222 68 96

Period of work: from 01.05.2012 to 03.12.2012

Home Supervisor: Prof. Dr. H. C. Flemming

Host Supervisor: Prof. Dr. U. Schröder

Declaration:

Herewith I declare that this thesis is the result of my independent work. All sources and auxiliary materials used by me in this thesis are cited completely.

Essen, 03.12.2012

.....

Robert Keith Brown

### **Contact Information**

Robert Keith Brown  
Wilhelmstr 30 – 34  
38100 Braunschweig  
Robert.Brown@gmx.de  
0049 (0)178 604 87 73

Prof. Dr. H.-C. Flemming  
Biofilm Center  
Faculty of Chemistry  
University Duisburg-Essen  
Universitätsstr. 5  
45141 Essen  
hc.flemming@uni-due.de  
Tel: 0049 (0)201 183 6601

Prof. Dr. U. Schröder  
Institute of Environmental and Sustainable Chemistry  
TU-Braunschweig  
Hagenring 30  
38106 Braunschweig  
uwe.schroeder@tu-bs.de  
Tel: 0049 (0)531 391 8425

I would like to thank Prof. Flemming for agreeing to be my home supervisor, Prof. Schröder, Dr. Harnisch and Sebastian Wirth for their support and help in doing my master thesis at the institute of Environmental and Sustainable Chemistry. Thank you also to the cooperation partners in the DBU-project at the institute of Sanitary and Environmental Engineering, TU Braunschweig.

## Abstract

In this study a bioelectrochemical system which was run as a microbial electrolyser was tested in terms of its development to prototype scale. This was determined by comparing prototype results using a total volume of 100 L with similar experiments done at laboratory scale of 200 mL to determine the effects of scaling-up on current generation and Coulombic efficiency. Also the wastewater treatment efficiency of the prototype was compared to both laboratory results and treatment rates from the wastewater treatment plant "Steinhof" (KWS). The results were obtained from electrochemical measurements using a 3-electrode setup controlled by a potentiostat and chemical analysis of wastewater samples taken from before, during and after laboratory experiments and prototype trials focusing on substrate concentration i.e. acetate concentration or chemical oxygen demand (COD) level, total Kjeldahl nitrogen (TKN) amounts and on operating parameters such as pH value. The prototype was better at treating wastewater than the laboratory scale setup with a COD reduction rate of  $36 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}\text{d}^{-1}$  vs.  $23.7 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}\text{d}^{-1}$ . The prototype COD reduction results and TKN reduction rate of  $2 \text{ mg NH}_4\text{-N L}^{-1}\text{d}^{-1}$  are lower than the rate of the KWS plant by a factor of 19. TKN reduction was in this case equivalent to total nitrogen reduction because  $\text{NO}_2^-$  and  $\text{NO}_3^-$  were not found in either the synthetic or the real wastewaters. Also prototype current density output and Coulombic efficiency were lower than in the laboratory experiments with both synthetic, 83 % lower, and real, 43 % lower, wastewater. If the prototypes surface to volume ratio of  $0.19 \text{ cm}^2\text{cm}^{-3}$  can be increased to  $3.6 \text{ cm}^2\text{cm}^{-3}$  then this should assuming a linear increase of performance bring the prototype to with in the same treatment efficiency as the KWS plant. In order to boost current output pH splitting should be negate using anolyte and catholyte cross-over and this would also prevent phosphate diffusion from the catholyte, which was observed during prototype trials, because the use of a phosphate buffer would be unnecessary. This should also help improve overall microbial activity which would also increase Coulombic efficiency. As it stands the prototype was near to the required reduction values stipulated by European law in the "Urban Wastewater Directive" of 75 % COD reduction and 70 – 80 % total nitrogen reduction.

## Table of Content

|      |   |    |
|------|---|----|
| 1.   | Introduction: Motivation for this Study .....   | 1  |
| 1.1. | Theoretical Background: Biofilms and Bioelectrical systems.....   | 1  |
| 1.2. | The Role of MFCs: Publications and Patents.....   | 5  |
| 1.3. | Life-Cycle Assessment .....   | 8  |
| 2.   | Aims of this study.....   | 10 |
| 3.   | Materials and Methods.....  | 11 |
| 3.1. | Synthetic Wastewater: Acetate as a substrate .....  | 13 |
| 3.2. | Real wastewater(s) and Inoculate source .....   | 15 |
| 3.3. | Electrochemical Analysis: Chronoamperometry.....  | 16 |
| 3.4. | Real Wastewater: Chemical Analysis .....  | 21 |
| 3.5. | Calculating Theoretical Charge Values for Real Wastewaters .....  | 23 |
| 3.6. | Acidification to Increase Organic Acid Content .....  | 24 |
| 3.7. | Spiking with Acetate and ammonium .....   | 25 |
| 4.   | Results and Discussion .....  | 26 |
| 4.1. | Influence of Residual and Accumulated Biomass .....   | 26 |
| 4.2. | Results of Laboratory Experiments with Synthetic Wastewater .....   | 27 |
| 4.3. | Prototype Trials using Synthetic Wastewater .....   | 30 |
| 4.4. | Screening: Real wastewater at laboratory scale .....  | 33 |
| 4.5. | Results of the trials with real wastewater at prototype scale .....   | 38 |
| 5.   | Conclusions: Scaling-up.....  | 47 |
| 6.   | References.....   | 52 |
|      | Appendix 1: Wastewater treatment data for the wastewater treatment plant „Steinhof“<br>courtesy of the „Abwasserverband Braunschweig“ ..... | 55 |

# 1. Introduction: Motivation for this Study

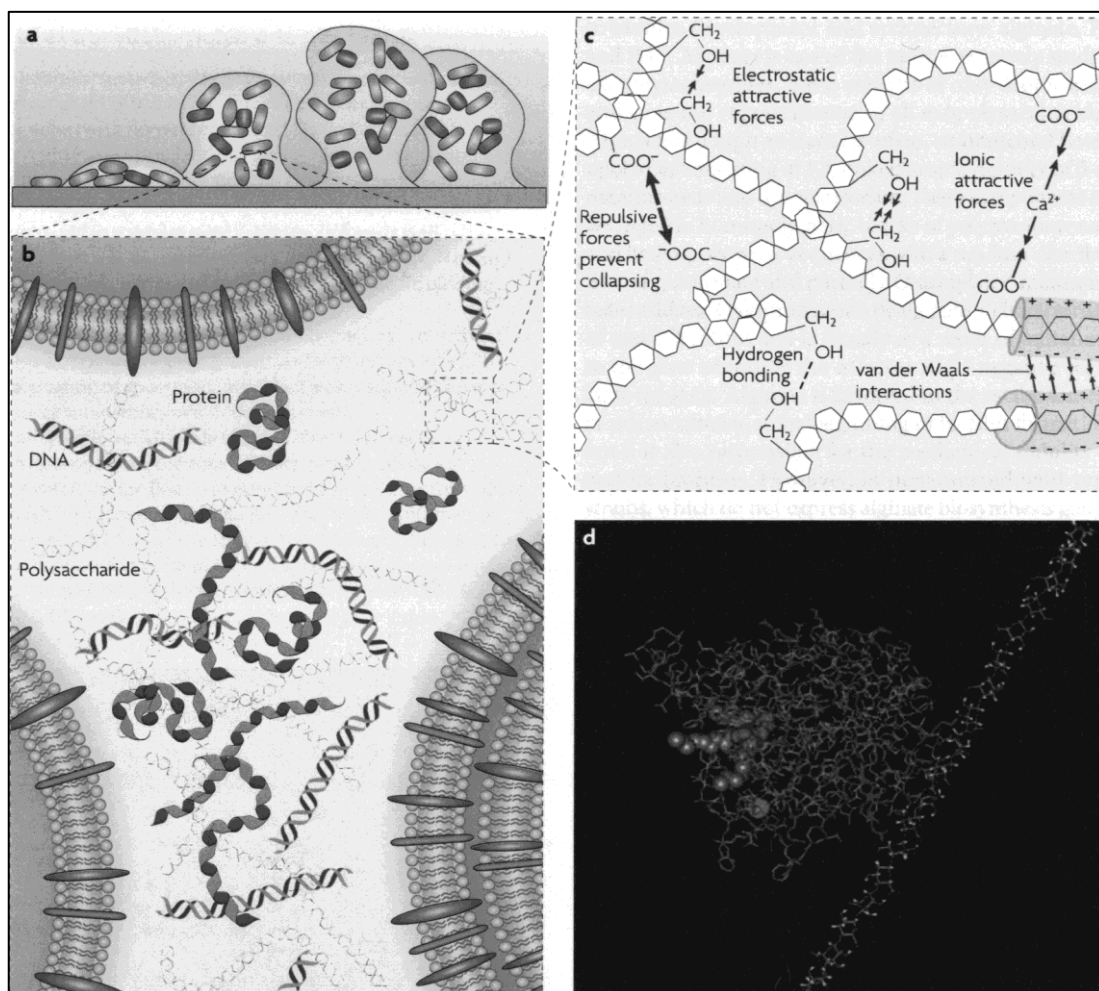
In this day and age mankind is confronted with ever increasing difficult situations e.g. how are we to guaranty an effective energy supply for future generations? How can we deal with increasing waste production? These two questions are the main reason for this study. The world's population increases constantly (United Nations, 2011). The energy demand is increasing across the world from year to year (British Petroleum, 2005), as is the amount of rubbish and waste which mankind produces.

Where ever there are people waste will be produced and energy is required to deal with both the produced waste and for human needs. Human waste such as urine, faeces and cleaning water eventually end up in wastewater treatment plants where the wastewater is treated to a level at which it can be introduced into the environment without causing environmental problems. The treatment process is energy consuming and as such should be improved to be either more energy efficient or at best energy producing. In light of the fact that major energy resources, i.e. fossil fuels, are limited the use of renewable energy and gaining energy from waste products is becoming more necessary. The first steps in this direction have already been implemented in the form of the anaerobic digestion systems which produces biogas (mainly methane) which can be burnt in a gas-turbine to produce electrical energy.

## 1.1. Theoretical Background: Biofilms and Bioelectrical systems

The use of microbial fuels cells (MFC) which both have the capacity for wastewater treatment and energy production could be a solution to improving wastewater treatment while being more energy efficient or producing energy. MFCS use microorganism which live in biofilms as do more than 99% of microorganisms (Costerton, *et al.*, 1987). Biofilms, as described by (Wingender, *et al.*, 1999), are characterized by a heterogeneous architecture primarily composed of carbohydrates, lipids, proteins, nucleic acids, and other components are grouped

together as extracellular polymeric substances (EPS). A schematic representation of a biofilm is shown in *Figure 1*, taken from Flemming & Wingender (2010). Biofilms which are made of microorganisms and EPS components play an important role in biological degradation of organic and inorganic compounds which is essential for the operation of a bioelectrochemical system. Bioelectrochemical systems (BES) use biofilms which interact with the solid phase electrode to combine electrochemical and biological process to generate a variety of products such as electricity,  $H_2(g)$ , etc.

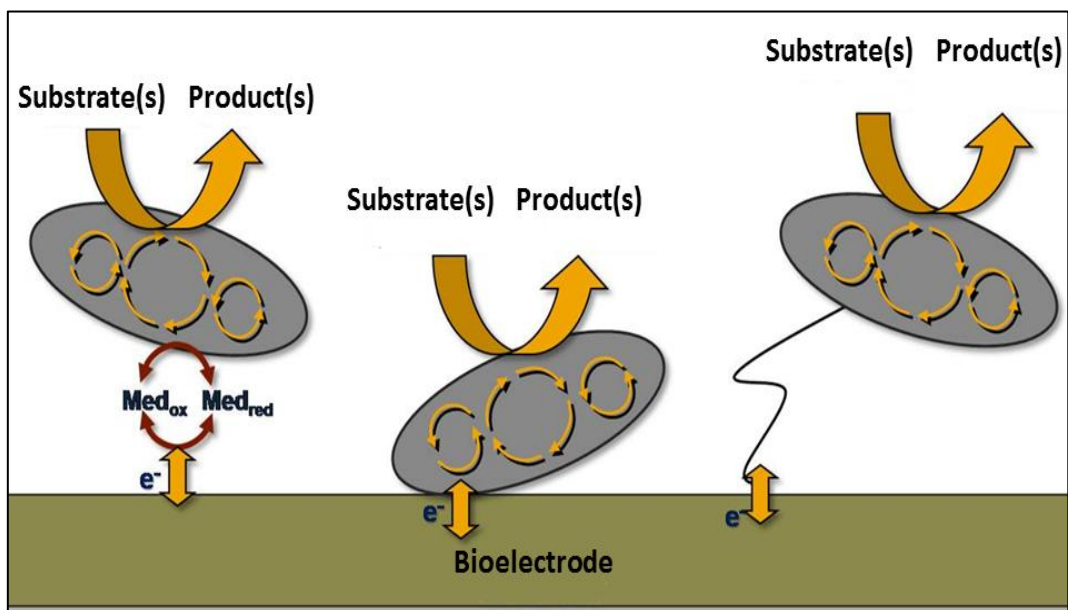


*Figure 1: Scheme of an EPS-matrix; a) Model biofilm attached to a surface; b) Major matrix components DNA, proteins and polysaccharides; c) Classes of weak physiochemical interactions; d) Molecular model of an enzyme (left), lipase, attached to a polysaccharide (right), alginate, of *Pseudomonas aeruginosa* Flemming & wingender (2010).*

Bioelectrochemical systems (BES) utilise electroactive bacteria (EAB) which form a biofilm on the electrode surface thereby creating a bioelectrode. EAB can use the electrode as a terminal electron acceptor or electron donor using extracellular

electron transfer (EET) mechanisms to link their metabolic pathways to the electrochemically active electrode surface. Three types of EET mechanisms have been identified and are shown in *Figure 2*, whereby mediator assisted electron transfer and direct electron transfer over cytochromes or iron-sulphur proteins are the best understood with more research still being done on electron transfer through microbial nanowires (Rabaey, *et al.*, 2010).

Mediator assisted electron transfer can utilize both inorganic metal ion such as  $Fe^{3+}/Fe^{2+}$  for electron transfer and organic shuttle molecules like phenazines or quinones (Schröder, 2007). Direct electron transfer from cytochromes and iron-sulphur proteins has been investigated in depth for *Shewanella oneidensis* and *Geobacter sulfurreducens* (Rabaey, *et al.*, 2010) with both microorganisms showing various heme-type cytochromes which can participate in both mediator assisted and direct electron transfer from cytochromes.

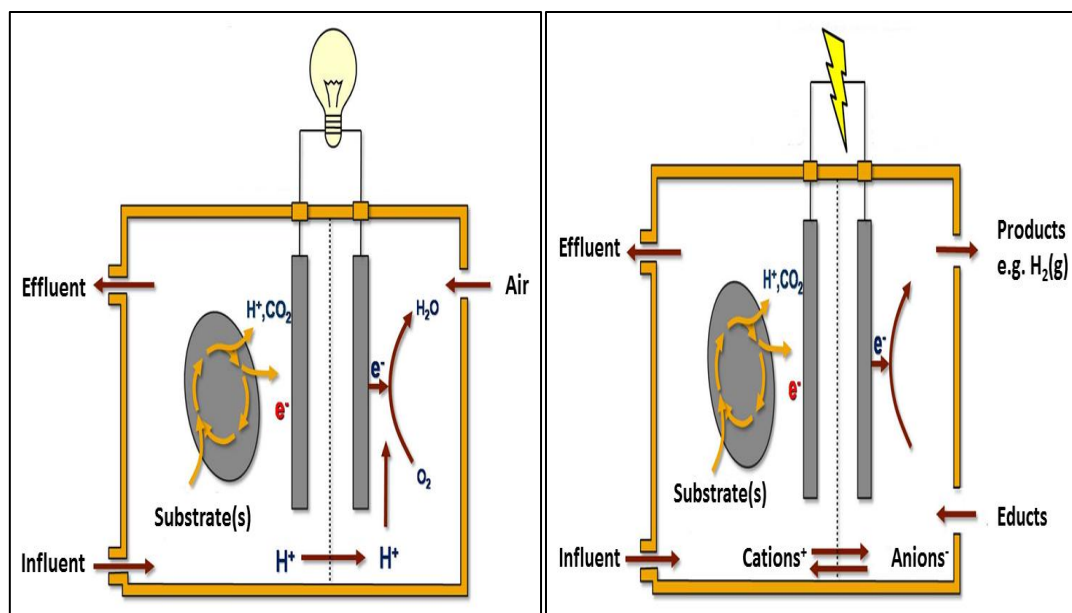


*Figure 2: Three types of extracellular electron transfer mechanisms. From right to left: mediator assisted electron transfer, direct electron transfer from cytochromes or iron-sulphur proteins and over microbial nanowires. Adapted from Schröder, 2006.*

The term bioelectrochemical systems (BES) encompass several setups which have different functions and provide different products. The two main categories of BESs are microbial fuel cells (MFC) and microbial electrolyzers (MEC) each with a distinct



mode of operation. The basic setup of a microbial fuel cell is shown in *Figure 3*, left hand figure. Here substrate is given into the anode chamber where EAB attached to the electrode surface utilise the substrate to generate energy through catabolic processes for anabolic process i.e. for the microorganisms themselves. In this case EAB use the electrode as the terminal electron acceptor. Protons are also produced and will cross to the cathode half-cell where together with the incoming electrons they can be used to reduce oxygen to water. This is called the oxygen reduction reaction (ORR) and is typical of MFCs allowing them to generate electricity while treating wastewater for example. The other basic setup is that of a MEC, *Figure 3*; right hand, substrates are utilised in the same way as in a MFC but instead of using ORR e.g.  $H^+$  can be reduced to  $H_2(g)$ , termed hydrogen evolution reaction (HER) which is gained as a product. This process can also be used to generate alkaline solutions such as potassium hydroxide solution. MECs therefore can be used to treat wastewater and generate useful chemical products. A lot of different applications for BESs are possible using either pure MFC or MEC setups or a combination of both. It is also possible to use an EAB biofilm on the cathode to specifically generate organic molecules (Harnisch & Schröder, 2010), in MECs using redox potential generated by an EAB biofilm on the anode.



*Figure 3: Left: Basic microbial fuel cell (MFC) setup using oxygen reduction reaction to drive electricity production. Right: Basic microbial electrolyser cell (MEC) setup generating electrochemical products in the cathode chamber. Adapted from Schröder, 2006.*

Although a BES using almost the same basic setup can be run as either a MFC or MEC in this study the MEC mode was used because this mode generally provides more stable current measurements and allows for a better comparison of results with the laboratory scale experiments. This being said the measures which would improve MEC performance will also do the same for MFC performance and as such the term MFC will be used to describe this prototype because of the superseding goal of using this system for electricity production.

## **1.2. The Role of MFCs: Publications and Patents**

In order to advance microbial bioelectrochemical systems (BES), such as microbial fuel cells (MFC) and microbial electrolyser cell (MEC), beyond laboratory scale to a stage at which they can be used reliably on a day to day basis, various aspects need to be optimized. Before BESs can be optimized, one must understand the role which the BESs should fulfil. After the role of the BES has been chosen two questions have to be answered. The questions which have to be answered, if BESs are to become commercially competitive, are: Firstly, is there a problem which can be solved and solved better by using a BES as opposed to another solution? Secondly, what level of performance has to be reached in order to justify the use of a BES?

The first question can be answered in part by looking at the amount of research being invested into the development of BESs and at past research experiments which have resulted in successful patent applications. The following information was gathered from publically accessible websites, courtesy of SciVerse<sup>™</sup> (2012), SciFinder<sup>™</sup> (2012), and World Intellectual Property Office (2012), and is not necessarily an indication of research being performed in the private sector. As shown in *Figure 4*, the numbers of publications and patents about BESs have been increasing steadily over the last decade, where by the stronger research focus has been on MFCs specifically, compare *Figure 4a* to *4b* and *4c* to *4d*.

The fact that BESs solutions are not only being tested in laboratories but also are of a quality and distinctiveness which allows for successful patent application indicates that BESs can be used to solve various problems, see below for a brief description of the development in BES diversity. The question as to whether or not BESs are better suited to deal with a specific problem must be discussed in a more detailed and specified context. At this point, it will suffice to note that BESs certainly have the potential to be competitive from the stand point of a researcher's perspective.

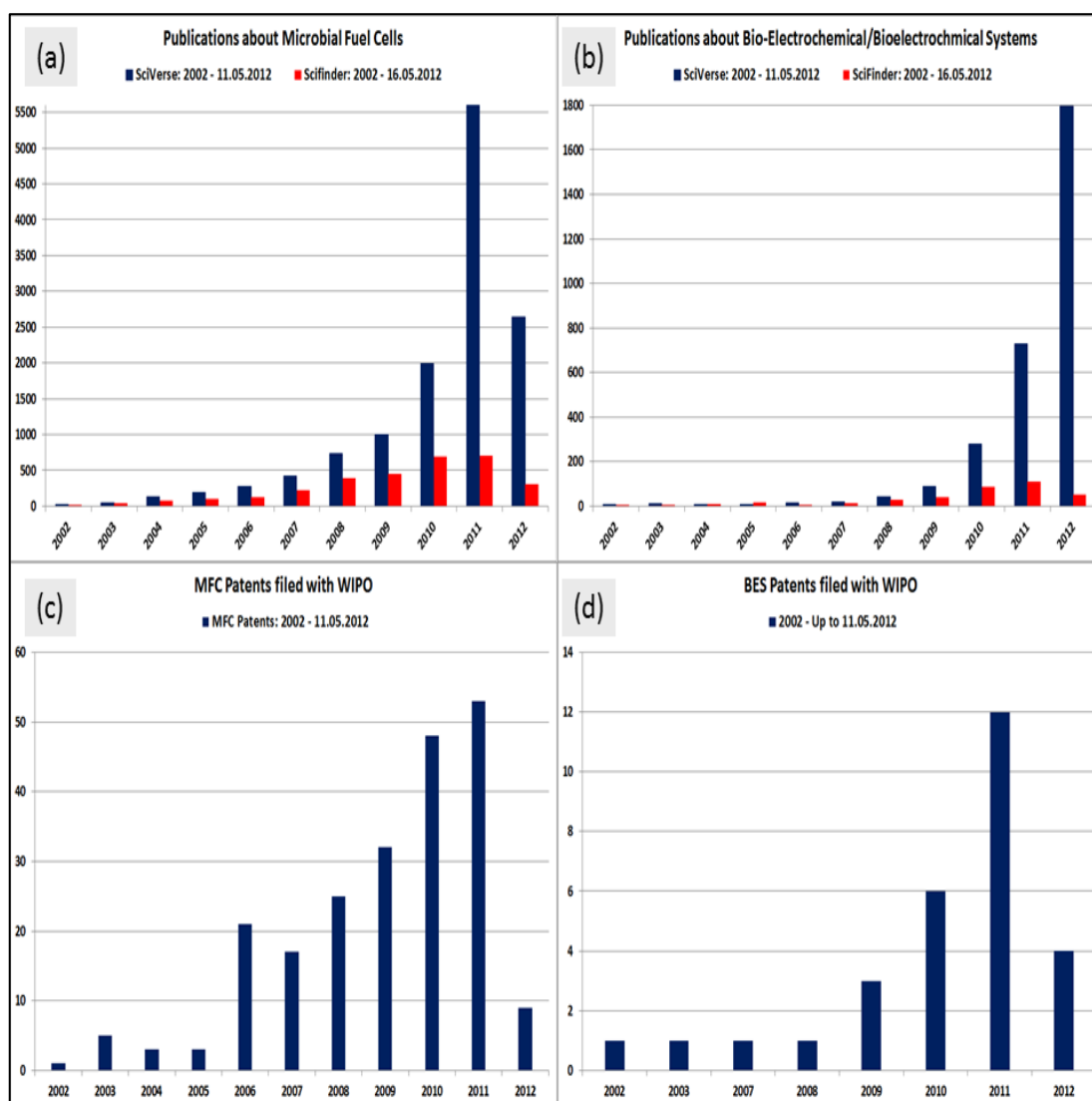


Figure 4: Results of database keyword searches on: The number of publications about microbial fuel cells (MFC) (a) and Bioelectrochemical systems (BES) (b), courtesy of SciVerse™ (2012) and SciFinder™ (2012). The number of patents filed with World Intellectual Property Office (WIPO)(2012) about MFCs (c) and BESs (d). Search time frame from 01.2002 – 05.2012.

The number of patents and publications released over the last decade hint at the wide variety of possible applications for BESs. To understand the role of BESs in the

years to come, one should look at the history of the development of the technology. *Table 1* lists a small selection of patents from one of the first patents from MFC research in 1967 held by J. B. Davis (US 3305399) to one of the most recent patents, 2012, held by Silver *et al.* (WO 2012054629). During this time the term bioelectrochemical system was defined to incorporate all forms of systems which use biological and electrochemical elements. This study however will be focused on microbial BESs as opposed to enzymatic BESs.

*Table 1: A selection of patents and short descriptions thereof from 1967 up to 05.2012 ((Biffinger, et al., 2008) (Yang, et al., 2010)(World Intellectual Property Office (2012)). BES: bioelectrochemical system, MFC: microbial fuel cell, MEC: microbial electrolyser cell.*

| Year | Person(s) and Patent Nr.   | General Information and Focus of the Patent  |
|------|--|--|
| 1967 | J. B. Davis<br>US 3305399  | Externally mediated MFC (Methylene blue, mediator), <i>Nocardia salmonicolor</i> , environmental Bacteria, 0.05 mA.  |
| 2006 | M. Chiao, L. Lin and K. B. Lam<br>US Patent 7160637                  | Implantable, miniaturized microbial fuel cell, integration of micro-electro-mechanical systems (MEMS) into MFCs enables micro-fabrication of electrodes, etc. in the MFC, usable mainly in miniature MFCS. |
| 2010 | K. Rabaey, H. Pieter, A. Leo<br>and R. A. Rozendal,<br>WO 2010042986 | BES/MEC, focus on the production of hydrogen peroxide from aqueous wastewater, microorganisms generate current and $H_2/H^+$ (bio-electrochemical), $H_2O_2$ (electrochemical) formed at the cathode.      |
| 2012 | M. Silver, J. Buck, J. Kiely<br>And J. J. Guzman<br>WO 2012054629    | General mixed BES/MFC design to produce electricity, $H_2(g)$ and $CH_4(g)$ , i.e. multi-role treatment system for liquid/gas organic containing wastes, multiple products increase economic efficiency.   |

Davis's patent focused on the fuel cell aspect of BESs, very similar to a hydrogen fuel cell, i.e. a way of converting chemical energy directly to electrical energy, as

efficiently as possible. BESs have changed and diversified greatly since 1967. BES research has begun to shift focus in two main directions:

- Small scale applications such as implantable miniature MFCs to e.g. power pacemakers or MFCs containing and powering micro-electro-mechanical systems (MEMS) enabling micro-fabrication at the electrode surface (US 7160637, Chiao *et al*, 2006).
- Treatment systems for liquid/gas organic containing wastes to gain multiple products, e.g. treated wastewater and, electricity in the case of a MFC or treated wastewater and, a chemical product, e.g. hydrogen peroxide in the case of a microbial electrolyser cell (MEC) (WO 2012042986, Rabaey *et al*, 2012) (WO 2012054629, Silver *et al*, 2012)

### **1.3. Life-Cycle Assessment**

According to the principles Life-cycle assessment (LCA), as stated in ISO 14040, one should perform: (a) definition of the goal(s) and, scope, (b) an inventory analysis, (c) impact assessment and (d) interpretation. For the purpose of this study a full LCA is not possible nor is it necessary because the prototype is still in development and is currently not ready for full industrial level trials. The basic approach for apply LCA to bioelectrochemical systems has been stated by Pant *et al.*, 2011, where they showed that BES solutions can be competitive and even better than conventional wastewater treatment systems if they can be brought up to higher performance levels using state of the art materials and designs.

The target goals should be set based on an environmental approach i.e. quality of the released wastewater and based on an economic approach i.e. treatment efficiency and energy efficiency, either produced or required. In terms of the quality of the released wastewater a BES solution should aim at reducing chemical

oxygen demand, total nitrogen and total phosphorus levels to levels which have been set by government authorities (Foley, *et al.*, 2010 (b)). In Europe the limits are stipulated in the “Urban wastewater Directive” a subsection of the “Water Framework Directive” as of 2010 which states that:

- Chemical oxygen demand must be reduced to 125 mg O<sub>2</sub>/L or by 75 %.
- Total nitrogen must be reduced to 15 mg N/L – 10 mg N/L\* or by 70 % - 80 %.
- Total phosphorus must be reduced to 2 mg P/L – 1 mg P/L\* or by 80 %.

\*Based on the total population equivalent of the wastewater treatment plant.

These goals and improved economic standing of BESs can be achieved by either microbial fuel cells or microbial electrolyzers if a conversion level of 1000  $\mu\text{Acm}^{-3}$  (Foley, *et al.*, 2010 (a)) at a surface to volume ratio of 100  $\text{cm}^2\text{cm}^{-3}$  (Rozendal, *et al.*, 2008). Also a Coulombic efficiency of at least 40 % should be achieved i.e. because this is the energy conversion efficiency of a gas turbine, without factoring in sludge digestion conversion of organic carbon to methane.

## 2. Aims of this study

The aim of this study is to assess the readiness of a prototype bioelectrochemical system (BES) which will be used to treat synthetic wastewater and real wastewater. Said BES can be used as either a microbial fuel cell (MFC) or a microbial electrolyser (MEC). In this case both laboratory experiments and prototype trials will be performed in MEC mode. Prototype trials will be compared to laboratory experiments which will also test synthetic and real wastewater and to the activated sludge basin of a real wastewater treatment plant from which the wastewater samples were taken to determine the effects of scaling-up. The main goal is to find out what measures should be taken to improve overall performance. The parameters used to assess the state of the prototype are:

- Achievable maximum current density ( $j_{\max}$ ) given as current per surface unit; [ $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ].
- Operating Coulombic efficiency (CE) to determine energetic efficiency of the BES in [%] based on maximum theoretically gain able charge.
- Reduction rates compounds which are part of a wastewater i.e. using the parameters:
  - Chemical oxygen demand (COD) in [ $\text{mg O}_2/\text{L}$ ]
  - Total Kjeldahl nitrogen (TKN) as the sum of ammonium and organic nitrogen in [ $\text{mg NH}_4\text{-N}/\text{L}$ ].
  - Fate of total phosphorus in the system including organic phosphorus and inorganic o-phosphate in [ $\text{mg PO}_4\text{-P}/\text{L}$ ].
- Measurement of the pH value which effects microbial activity and, electrochemical reactions.

### 3. Materials and Methods

In order to understand the systematic changes, restrictions and problems involved with scaling up a bioelectrochemical system (BES) from laboratory scale (200 mL, round-bottom flask, *Figure 5a* to prototype scale (30 L anode cuboid reactor, 100 L total in circulation, *Figure 5b* and *5c*, one should run the identical or as similar as possible experiments at both laboratory and at prototype scales. Both the prototype and laboratory setups utilise electroactive bacteria which grow as a biofilm on the anode and the same synthetic wastewater and real wastewater was used.

The two main differences in the experimental setups can be seen by comparing *Figure 5d* and *5e*. Firstly, the absence of a stirring bar in the prototype setup. This is replaced by circulating the wastewater through the anode chamber back into the storage vessel and then back to the anode. This is done for the same reason as using a magnetic stirring bar i.e. to prevent substrate turnover limitation through diffusion kinetics. Laboratory experiments were only performed as batch experiments without an liquid exchange. In the prototype trials both batch and closed loop modes were used whereby batch mode was used for the initial growth cycle and closed loop was used for all of the following cycles.



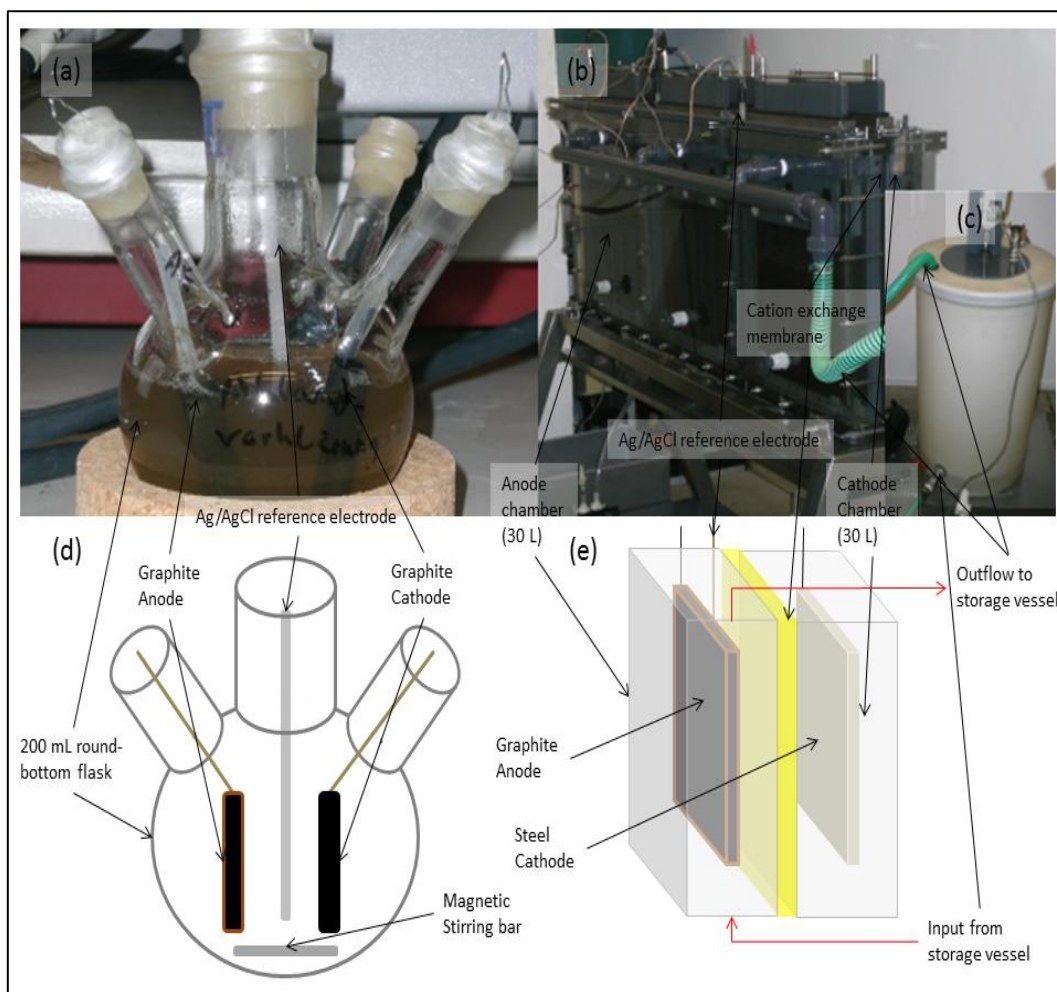


Figure 5: (a) 200 mL laboratory and 100 L prototype scale, where (b) shows the 30 L anode chamber, (c) the storage vessel (max. 120 L); Total volume used in the prototype was 100 L, schematic representation of (d) a 200 mL laboratory scale reactor and (e) the 30 L anode and, cathode chambers separated by a cation exchange membrane.

Secondly, the presence of a cation exchange membrane (CEM) separating the anode and cathode. A separator is mainly used when running a MFC to generate electricity without applying a voltage i.e. utilizing the oxygen reduction reaction (ORR). ORR can be performed at laboratory scale without using a CEM but in our case this was not done and was also not done in the prototype trials. In this study both the experiments run at laboratory scale and, prototype scale were done using an applied voltage and utilizing the hydrogen evolution reaction (HER) at the cathode i.e. the systems were run in microbial electrolyser mode in order to judge the effects of scaling up.

The central electrochemical parameter which was measured is the current which passed from the anode through the potentiostat to the cathode during each

experiment. The current was measured at a constant pre-set anode voltage of 0.2 V vs. Ag/AgCl because this best suits electroactive bacteria growing at the anode, as described by Logan *et al.* (2010). The anode voltage was adjusted by the potentiostat based on the voltage measured against the Ag/AgCl-reference electrode. Electrode materials play a central role in BES design and as such the materials used in this study are listed in *Table 2*. Please note that the same anode material namely graphite was used in both the prototype and laboratory setups. The total anode surface areas for laboratory and prototype scale experiments are also listed in *Table 2* and these will be used to calculate the geometric projected current density (*j*) which can then be used to compare results obtained using different setups.

*Table 2: Electrode materials used in laboratory and prototype experiments.\* Electrode surface area used only in the synthetic wastewater trials with acetate in the laboratory experiments.\*\* Surface area only used in the first prototype trials using synthetic wastewater with acetate.*

| Scale      | Reference Electrode   | Cathode Material       | Anode Material        | Total Area Anode [cm <sup>2</sup> ] |
|------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-------------------------------------|
| Laboratory | Ag <sup>+</sup> /AgCl | Graphite rod           | Graphite rod          | 13.35 / 14.92*                      |
| Prototype  | 0,199 V vs. SHE       | V2A Steel square plate | Graphite square plate | 4436 / 6654**                       |

### 3.1. Synthetic Wastewater: Acetate as a substrate

The first set of experiments were performed to determine the average Coulombic efficiency (CE) and maximum current density (*j*) from treating a defined volume of synthetic wastewater at both laboratory and prototype scales. This was done using different setups, as shown in *Figure 5*, but with the same medium or more specifically the same synthetic wastewater. The substances and their concentrations are listed in *Table 3* based on the work of Balch *et al.*, 1979, and Kim

*et al.*, 2005. Synthetic wastewater has a defined concentration of a known substrate; in this case acetate was used as the substrate. The only variation is that 1.64 g/L or 20 mM of acetate was used in the prototype setup in addition to 0.82 g/L or 10 mM of acetate.

*Table 3: Substances and their concentrations given in [g/L] equivalent to 10 (20) mM acetate synthetic wastewater (Balch, et al., 1979), (Kim, et al., 2005).*

|                                      | Concentration |                                    | Concentration |
|--------------------------------------|---------------|------------------------------------|---------------|
| Substance                            | [g/L]         | Substance                          | [mg/L]        |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>     | 2,69          | AlK(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> | 0,125         |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>     | 4,33          | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>     | 0,125         |
| NH <sub>4</sub> Cl                   | 0,13          | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>   | 0,125         |
| Na-Acetate                           | 0,82 (1,64)   | Biotin                             | 0,025         |
| Nitriloacetic acid                   | 0,01875       | Folic acid                         | 0,025         |
| MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O | 0,0375        | Pyridoxine hydrochloride           | 0,125         |
| MnSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O  | 0,00625       | Thiamine hydrochloride             | 0,0625        |
| NaCl                                 | 0,0125        | Riboflavin                         | 0,0625        |
| FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O | 0,00125       | Nicotinic acid                     | 0,0625        |
| CoCl <sub>2</sub>                    | 0,00125       | DL-calcium pantothonate            | 0,0625        |
| CaCl <sub>2</sub>                    | 0,00125       | Vitamin B12                        | 0,00125       |
| ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O | 0,001625      | 4-Aminobenzoic acid                | 0,0625        |
| CuSO <sub>4</sub>                    | 0,125         | Lipoic acid                        | 0,0625        |

When using synthetic wastewater one should also add real wastewater as an inoculum to increase the rate of electrode colonization and shorten the required growth phase. The ratio of added inoculum to medium was 1:19 for laboratory scale

and 1:24 for prototype scale experiments. Inoculum was added to the initial growth cycles and all of the following cycles if not mentioned otherwise.

### **3.2. Real wastewater(s) and Inoculate source**

The real wastewater used as an inoculum in the experiments in this study was taken from the wastewater treatment plant “Steinhof” (KWS), Brunswick Germany, shown in *Figure 6a*. It is denominated as primary wastewater and was taken from the full flow of the wastewater stream after passing through the mechanical raking and the grit channel as can be seen in *Figure 6b*. The second set of experiments was to screen different real wastewater types for the first trial run at prototype scale by testing each type of wastewater at laboratory scale. Three of the wastewater types were also collected from the KWS plant; namely, effluent after pre-treatment (EAPT) and centrate water from before (CBD) and, after (CAD) sludge digestion. EAPT is collected at the end of the pre-treatment channels, as shown in *Figure 6c*, after mechanical raking, grit channel passage, slow and, quick sedimentation and flotation treatment.

Centrate water which is defined as the liquid fraction won by removing water from the sludge which is collected throughout the wastewater treatment process and before or after the sludge has passed through the sludge digestion towers which can be seen in *Figure 6d*. In the case of KWS, CBD and CAD are produced by decanting the centrate after addition of polymers to the sludge and the liquid which is removed is called centrate water.

The other two real wastewater types were yellow water (Ger. “Gelbwasser”), which is mainly composed of urine and beer brewery wastewater provide courtesy of Wolters<sup>™</sup> brewery, Brunswick Germany. All five wastewaters were screened for prototype trials according to the lowest time of the lag phase and the highest current density produced in a laboratory scale MFC. The current density produced using different wastewaters were compared using the peak maximum values.

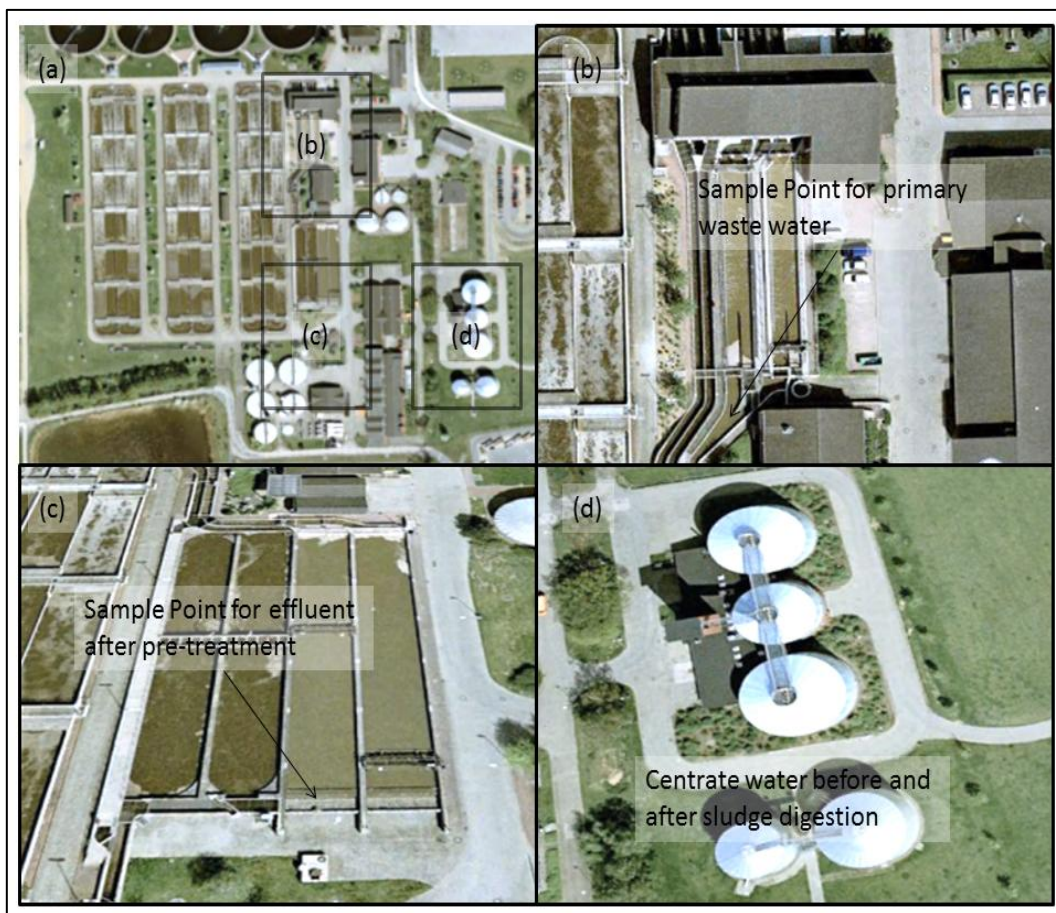


Figure 6: Aerial pictures of (a) the wastewater treatment plant "Klärwerk Steinhof" (KWS), (b) the sampling point of primary wastewater, (c) sampling point of effluent after pre-treatment and (d) the sludge digestion towers. Centrate water was collected before and after sludge digestion. Images courtesy of Google Earth, © 2012 Google™.

### 3.3. Electrochemical Analysis: Chronoamperometry

In this study the main analytical method is chronoamperometry (CA) which is carried out using a potentiostat with three electrode configuration. The electrode configurations in the laboratory and, prototype setups are shown in *Figure 5d/5e* and the electrode materials are listed in *Table 2*. The potentiostat is the "workhorse" of electrochemical studies. A schematic representation is shown in *Figure 7* whereby the operating principle is the same for both laboratory and prototype scale. In the case of CA experiments a constant voltage of 0.2 V vs. Ag/AgCl is applied to the working electrode, i.e. the anode. The voltage at the anode is maintained by applying a current to the counter electrode, i.e. the cathode. The target vs. actual voltage is monitored over the reference electrode

and is regulated by changing the cell voltage. Although a potentiostat can be used to perform experiments in which both current, chronoamperometry (CA) or voltage, e.g. cyclic voltammetry (CV), can be applied and measured in addition to experiment run-time, in this study only CA experiments were performed. CA was used to determine the Coulombic efficiency (CE) and current density ( $j$ ) by measuring the current ( $I$ ) which passes through the potentiostat divided by the electrode surface area.

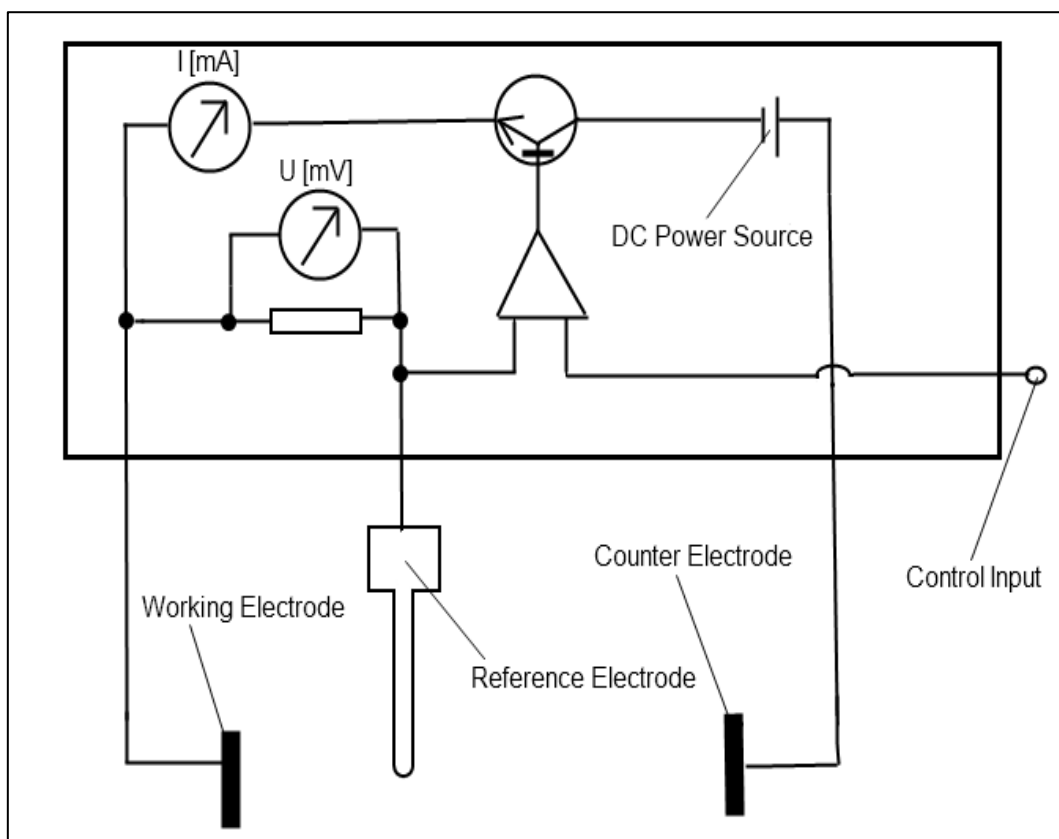


Figure 7: Schematic of the control/regulation electric circuit of a potentiostat using a three electrode setup.

CE of and current density generated by a MFC are the main parameters to categorise both the energy efficiency and energy producing capacity of a MFC. To determine these parameters MFCs at laboratory and prototype scales were tested using chronoamperometry (CA), whereby the current ( $I$ ) is measured against run-time ( $t$ ). Chronoamperic experiments were performed using a potentiostat with a three electrode setup as shown in *Figure 7*. The potentiostats used in this study

were from BioLogic™. Different models were used for laboratory and prototype tests and as such they are listed accordingly:

- Multichannel potentiostats VMP3 and MPG2 for laboratory scale experiments.
- Single channel potentiostat SP-150 and Amplifier VMP3B (20 V/20 A) for prototype scale experiments.

The potentiostats were controlled using EC-Lab® from BioLogic™. The EC-Lab® program settings used to run CA experiments are listed in *Table 4* with the exception of the run-time which varied from experiment to experiment whereas the other settings did not.

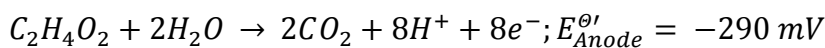
*Table 4: EC-Lab® program settings used in CA experiments at both laboratory and prototype scales. \* Laboratory/prototype.*

|                       |                   |                 |         |
|-----------------------|-------------------|-----------------|---------|
| CE vs. WE compliance  | -10 V to 10 V     | dI              | 5       |
| Ewe control range     | min/max = -2,50 V | unit dI         | µA      |
| Ei (V) vs. Ref        | 0.2               | dQ              | 0       |
| I <sub>max</sub>      | pass              | unit dQ         | mA.h    |
| unit I <sub>max</sub> | mA                | dt (s)          | 0.1     |
| I <sub>min</sub>      | pass              | dta (s)         | 60/300* |
| unit I <sub>min</sub> | mA                | E range min (V) | -2.5    |
| dQM                   | 0                 | E range max (V) | 2.5     |
| unit dQM              | mA.h              | I Range         | Auto    |
| record                | <I>               | Bandwidth       | 5       |

Using the current  $I$  and the experiment run time ( $t$ ) one can calculate the total charge ( $Q$ ) which passed through the potentiostat. This is done by integrating  $I dt$  which yields the total charge ( $Q$ ). The absolute current divided by the electrode surface area is the current density ( $j$ ). CE is calculated using the following equation:

$$CE = \frac{Q_{Practical}}{Q_{Theoretical}} \times 100\% \quad (1)$$

$Q_{Practical}$  is the total charge which passed through the potentiostat and  $Q_{Theoretical}$  is the total charge which could have been transferred to the electrode surface, travelled through the circuit to the cathode and been measured by the potentiostat. In the case of synthetic wastewater  $Q_{Theoretical}$  is calculated from the molar electron equivalent which is gained by oxidising a given substrate. Therefore  $Q_{Theoretical}$  is proportional to the acetate concentration in the bulk solution. In the case of acetate, as shown by Harnisch & Schröder (2010) a maximum of 8 electrons can be gained from the anodic oxidation of one molecule of acetate. The reaction equation is shown below.



$Q_{Theoretical}$  can therefore be calculated as a function of the acetate concentration using the following equations, where  $z$  is number of electrons,  $F$  is Faradays constant,  $96485.34 \text{ Cmol}^{-1}$ ,  $c_{acetate}$  is the concentration of  $n$  mol of acetate in the bulk solution  $V_{MFC}$ :

$$Q_{Theoretical} = z \times n \times F \quad (2)$$

$$n = c \times V_{MFC} \quad (3)$$



$Q_{\text{Theoretical}}$  can be calculated using equations (2) and (3) for both the 200 mL Laboratory scale and the 100 L prototype scale.  $Q_{\text{Theoretical}}$  for the laboratory scale at 10 mM acetate is 1543.76 C and for prototype scale at 10 mM or 20 mM acetate is 771883 C and, 1543765 C, respectively. Monitoring  $c_{\text{acetate}}$  can be used to characterise the treatment efficiency of a MFC however only to a limited degree because of the relative ease with which microorganisms can utilise acetate as a substrate and the simplified nature of synthetic wastewater. The acetate concentration was only measured in the prototype scale experiments and was only monitored to ensure complete or near to complete acetate consumption had been achieved for the purposes of calculating  $Q_{\text{Theoretical}}$ . Acetate concentration was measured using a HPLC with the follow specifications:

- HPLC-System: Spectrasystem P400, Thermo Fisher Scientific
- Finnigan Surveyor RI Plus Detektor, Fisher Scientific
- Column: Rezex ROA-Organic Acid H<sup>+</sup> (8%), column (300 x 7.8 mm)
- Eluent: 0.005 N Sulfuric acid
- Flow Rate: 0.5 mL/min

The limits of the calibration and average acetate concentration after each cycle are listed in *Table 5*. As can be seen in table 4 the acetate concentration after each cycle was below the limit of detection (LOD) and it can be assumed that the Coulombic efficiency calculations are reliable.

*Table 5: Listing the limits of the acetate calibration and the average pH and acetate values after a cycle*

|                                 |                           |
|---------------------------------|---------------------------|
| Limit of detection (LOD)        | 7 mM                      |
| Limit of identification (LOI)   | 14 mM                     |
| Limit of quantification (LOQ)   | 21 mM                     |
| $c(\text{Ac})_{\text{Anode}}$   | 0.2 mM $\leq$ LOD (n = 6) |
| $c(\text{Ac})_{\text{Cathode}}$ | 0.2 mM $\leq$ LOD (n = 7) |

### 3.4. Real Wastewater: Chemical Analysis

In the case of real wastewater with an unknown chemical composition the parameters which have to be measured to determine  $Q_{\text{Theoretical}}$ , for CE determination, and to characterise the treatment efficiency are manifold. All real wastewaters were prepared according to the follow procedure, as shown in *Figure 8*. First the sample is separated into two fractions an unprepared sample, denoted original (o) and a filtered sample, denoted filtrate (f). The parameters, shown *Figure 8*, are used to access the treatment efficiency, to calculate  $Q_{\text{Theoretical}}$  and to ensure the correctness of the cuvette tests. The stripe tests were from Merck<sup>™</sup>. Chemical oxygen demand (COD), ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), total Kjeldahl nitrogen (TKN), total suspended solids (TSS), sulphate ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) and total phosphorus (Tot. P) are parameters which can be used to access the treatment efficiency of a wastewater treatment method. In addition reduction of COD is used to calculate  $Q_{\text{Theoretical}}$  for real wastewater samples. Conductivity and pH were measured as control parameters to monitor if the system was running steadily. They were measured with hand-held units. The pH-meter had the following specifications:

- GPHR1400 A from Greisinger Electronic
- pH range 0.0 – 14.0

The conductivity meter conductivity meter had the following specifications:

- GLF 100 from Greisinger electronic
- Range: 0 – 2000  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , 0.00 – 20.00  $\text{mS}/\text{cm}$ , 0.0 – 100.0  $\text{mS}/\text{cm}$
- Operating temperature 5.0 – 80.0 °C

The cuvette tests used in this study are listed in *Table 6* along with their designation from Hach Lange<sup>™</sup>, detection range and chloride tolerance. The cuvette tests were carried out according to the instructions provided with each test by Hach Lange<sup>™</sup> and they were measured using a photometer with the following specifications:

- Spectral photometer: Cadas 50 from Hach Lange<sup>™</sup>

The photometer had pre-programmed measurement parameters provided by Hach Lange™, including wave length, test range and calibration function data. Each of the different cuvette tests were recognised by the photometer automatically by means of the individual barcodes of each test.

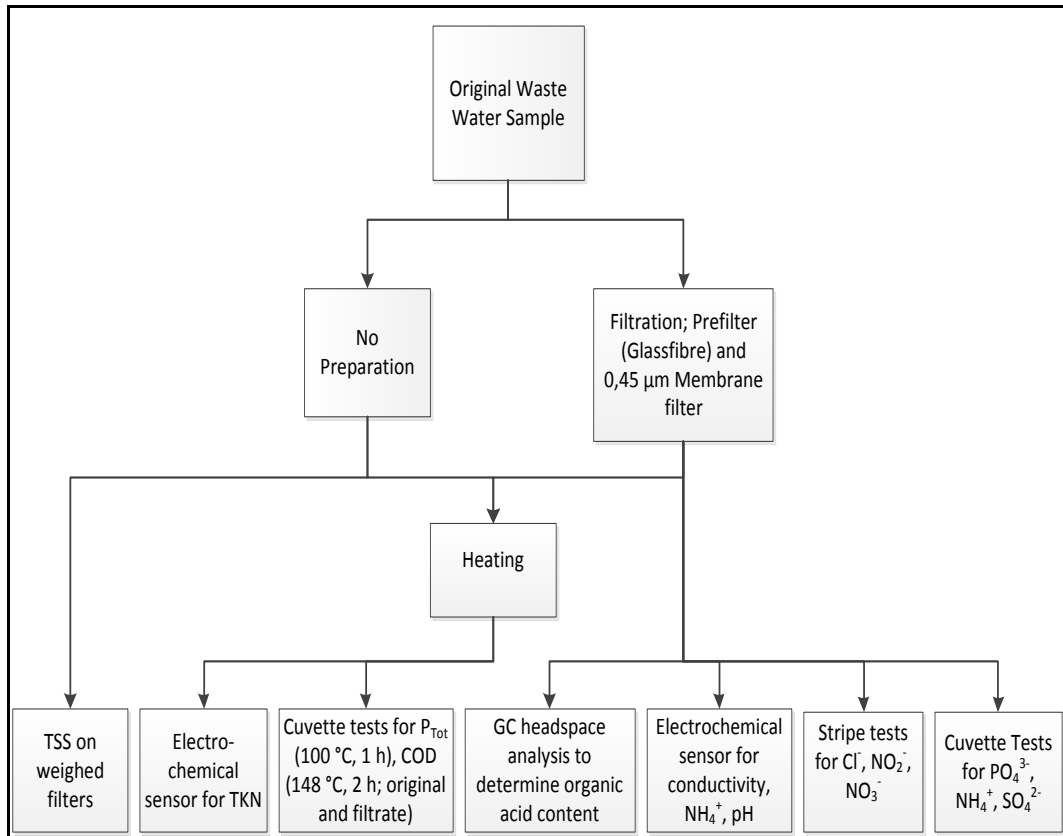


Figure 8: Real wastewater sample preparation and separation for analysis. The two fractions after preparation are denoted with (o): original and (f): filtrate. COD: chemical oxygen demand. TKN: total Kjeldahl nitrogen. TSS: total suspended solids

$\text{SO}_4^{2-}$  was measured as insoluble  $\text{BaSO}_4$  with results given as  $\text{mg SO}_4^{2-}$ .  $\text{PO}_4^{3-}$  and tot. P were measured as o- $\text{PO}_4^{3-}$  with results given as  $\text{mg PO}_4\text{-P}$ .  $\text{NH}_4^+$  and TKN were measured as  $\text{NH}_4\text{-N}$  with an electrochemical sensor from Metrohm™ or  $\text{NH}_4^+$  was measured using an indophenol blue complex in a cuvette test also as  $\text{NH}_4\text{-N}$ . Were  $\text{NH}_4^+$  could be measured directly with either the electrochemical sensor or cuvette test, TKN could only be measured after  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HgSO}_4$  were added then the sample was heated. COD was measured using Cr(V) reduction to Cr(III) and TSS are measured using the same two types of filters, however pre-weighed, as in the filtration step with a defined volume of 50 mL.

Please note that although chloride is not the only substance which can interfere with the cuvette tests, in the case of this study chloride ( $\text{Cl}^-$ ) was considered main problem factor and as such was tested whereas the concentrations of ions such as  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  or  $\text{CO}_3^{2-}$  can be disregarded. Each cuvette test has a specific detection range in which measurements are possible and reliable. Samples were diluted if the concentration was too high, as was necessary, to keep the concentrations within the calibration range. The samples were not stocked up to increase the concentration into the detection range because the aim is to treat wastewater and as such concentrations below the detection range were considered to be a success.

Table 6: List of the cuvette tests used in this study, their ranges and their chloride tolerance levels. N/A: not applicable.

| Test                                     | Designation | Detection Range                            | Chloride tolerance |
|--|-------------|--|--------------------|
| COD                                      | LCK 014     | 1000 - 10000 mg $\text{O}_2/\text{L}$      | N/A                |
|  | LCK 514     | 100 - 2000 mg $\text{O}_2/\text{L}$        | N/A                |
| $\text{PO}_4^{3-}/\text{P}_{\text{Tot}}$ | LCK 350     | 2 - 20 mg $\text{PO}_4\text{-P}/\text{L}$  | 2000 mg/L          |
|  | LCK 348     | 0.5 - 5 mg $\text{PO}_4\text{-P}/\text{L}$ | 10000 mg/L         |
| $\text{SO}_4^{2-}$                       | LCK 153     | 40 - 150 mg $\text{SO}_4^{2-}/\text{L}$    | N/A                |
| $\text{NH}_4^+$                          | LCK 303     | 2 - 47 mg $\text{NH}_4\text{-N}/\text{L}$  | 1000 mg/L          |

### 3.5. Calculating Theoretical Charge Values for Real Wastewaters

$Q_{\text{Theoretical}}$  can be calculated from the difference in measured COD from an untreated to treated wastewater sample. This is done using equations (2) and (3) following the same steps as when using acetate as a substrate (see above). The difference being that one has to convert the [COD] difference from [mg  $\text{O}_2/\text{L}$ ] to [mol  $\text{O}_2/\text{L}$ ] this is done as shown in equation (4) by dividing the [COD] difference by the molar mass of oxygen. In the case of [COD]  $z$  is equal to 4 because oxygen is reduced from 0 to  $-II$ .  $V_{\text{MFC}}$  is 100 L as in all prototype scale experiments.

$$Q_{Theoretical} = z \times n \times F \quad (2)$$

$$n = c \times V_{MFC} \quad (3)$$

$$Q_{Theoretical} = (z \times F \times [COD] \times V_{MFC}) / M_{O_2} \quad (4)$$

### 3.6. Acidification to Increase Organic Acid Content

“Effluent after pre-treatment” (EAPT) was put through an acidification step before the first cycle in the prototype. The setup for the acidification process is shown below in *Figure 9*. Each of the containers was filled with at least 30 L of EAPT which had a gas outlet and were attached to a gas-wash bottle filled with water. The purpose of this step was to increase the organic acid content by breaking down long chain compounds into multiple smaller sections resulting in an increase in the organic acid content which was measured as acetate equivalent [mg CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>/L] using a GC-FID with the following specifications:

- Chromatograph: HP 5890 Series II; FID-Detector
- Separation column: HP FFAP 30m x 0,53mm 1,0µm thickness
- Temperature: 90°C (7min) at 12°C/min to 115°C (3min) at 32°C/min to 220°C (2min)
- Injector: Temperature 220°C; split-less
- Auto sampler: HP 7673
- Carrier gas: He
- Injection volume: 1µL

An internal run standard was added to each sample in order to differentiate between and identify each of the substances peaks.



Figure 9: Setup for the acidification process carried out before the first prototype trial using "effluent after pre-treatment".

### 3.7. Spiking with Acetate and ammonium

The same biofilm, grown on acetate, was used during the prototype trials using "effluent after pre-treatment" (EAPT) as the medium. As such it was decided to test substrate limitation and the flow conditions in the prototype at the same time. The flow condition was not known at this time. To do this the medium, EAPT, was spiked with 20 mM  $\text{CH}_3\text{COONa}$  and 80 mM  $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ . Substrate limitation was determined based on if the measured current and therefore current density increased. The current was measured using an unchanged setup as described above. The flow-conditions were determined based on the development of the measured chemical oxygen demand (COD) values of 180 min. The development of the COD value in this time frame is equivalent to the distribution of acetate in the prototype. COD was measured using the same cuvette tests as mentioned above.

## 4. Results and Discussion

In the following sections the results the laboratory experiments and prototype trials will be presented and discussed. The discussion will be about the specific results but not their implications for the scaling-up process. The scaling-up process will be dealt with in chapter 5: Conclusions: Scaling-up. The first set of experiments was done to determine the Coulombic efficiency (CE) and maximum current density ( $j_{\max}$ ) based on projected geometric surface area at prototype and laboratory scales see chapter 3: Materials and Methods for more details.

### 4.1. Influence of Residual and Accumulated Biomass

In the following section the results of the trials with synthetic and real wastewater are presented. Firstly, however a part of working with biologically active systems will be discussed. A factor which influenced the results of this study was the accumulation of biomass during a cycle or residual biomass from previous cycles in the prototype. As such the influence of residual biomass after a cycle or accumulated biomass during a cycle which will be mentioned in the follow passages is explained here. *Figure 10* shows three examples of biomass accumulation the prototype observed over the two cycles. Whether the biomass was formed by microorganism or fungi it stands that assimilation or dissimilation of organic matter into or from these biomasses influenced the results of both the CA measurements and chemical analysis. For example a release of organic matter would cause an increase in measured COD or the uptake would be measured as part of the decreasing trend which is to be expected.

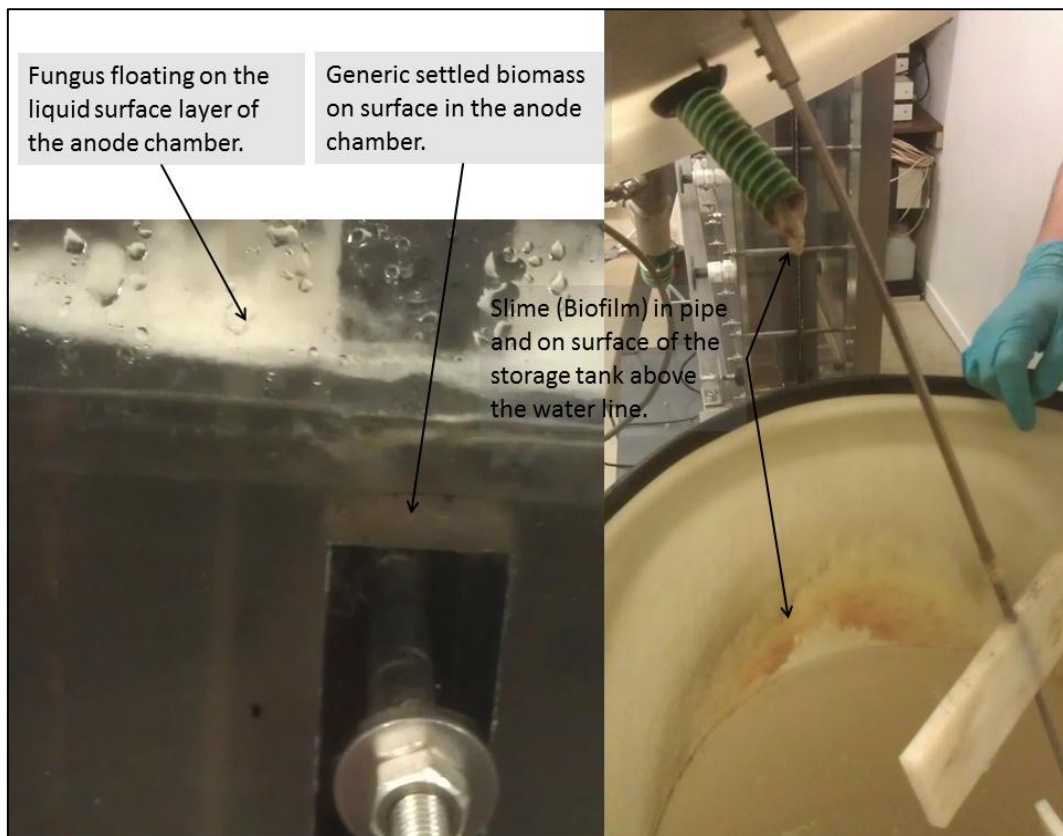


Figure 10: Examples of residual biomass after various to demonstrate the accumulation of organic matter in the prototype system.

Biomass in the biofilm on the electrode surface can also influence the measurements in a similar way and additionally microorganisms will tend to store excess energy and this can lead to a distortion of the CA measurements to higher values. This occurs because the microorganisms have more energy available in easily access able forms especially when the medium was switched from acetate containing synthetic wastewater to “effluent after pre-treatment” (EAPT). This could be the reason all Coulombic efficiencies determined for the real wastewater trials at prototype scale always yielded Coulombic efficiency values over 100 % in the range of 1000+ %. This cannot be due to statistical variation alone.

#### 4.2. Results of Laboratory Experiments with Synthetic Wastewater

The data from the laboratory experiments using 200 mL synthetic wastewater and 10 mM acetate as a substrate are provided courtesy of A. Baudler (2012, unpublished) as part of the DBU-project. The results of the acetate laboratory



experiments are shown in *Figure 11*. The growth cycle and two additional cycles are depicted together with the substrate concentration, Coulombic efficiency (CE) and maximum current density ( $j_{\max}$ ) in *Figure 11*. Although this is only one of several duplicates it shows the wide spectrum of results which are possible.

The biofilm growth cycle shows both the lowest CE of 67 %, and the lowest  $j_{\max}$  of  $100 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  of the three cycles which is to be expected. It is however unusual that the CE is higher than 50 % because this would mean that the biofilm did not use the majority, assuming no losses, of the available energy for biomass production i.e. in anabolic activities. There are two possible explanations for this observation: Firstly, the colonisation process was completed swiftly enough that the remaining acetate could be used mostly in catabolic processes which allow electrons to be transferred to the secondly. Secondly, the colonization process proceeded at a “normal” pace but the electrode had biofilm residue left from previous experiments which can be used as a substrate and enhances colonization. This means additional energy sources were available which were not taken into account when calculating the CE thus allowing for a high CE but low  $j_{\max}$ .

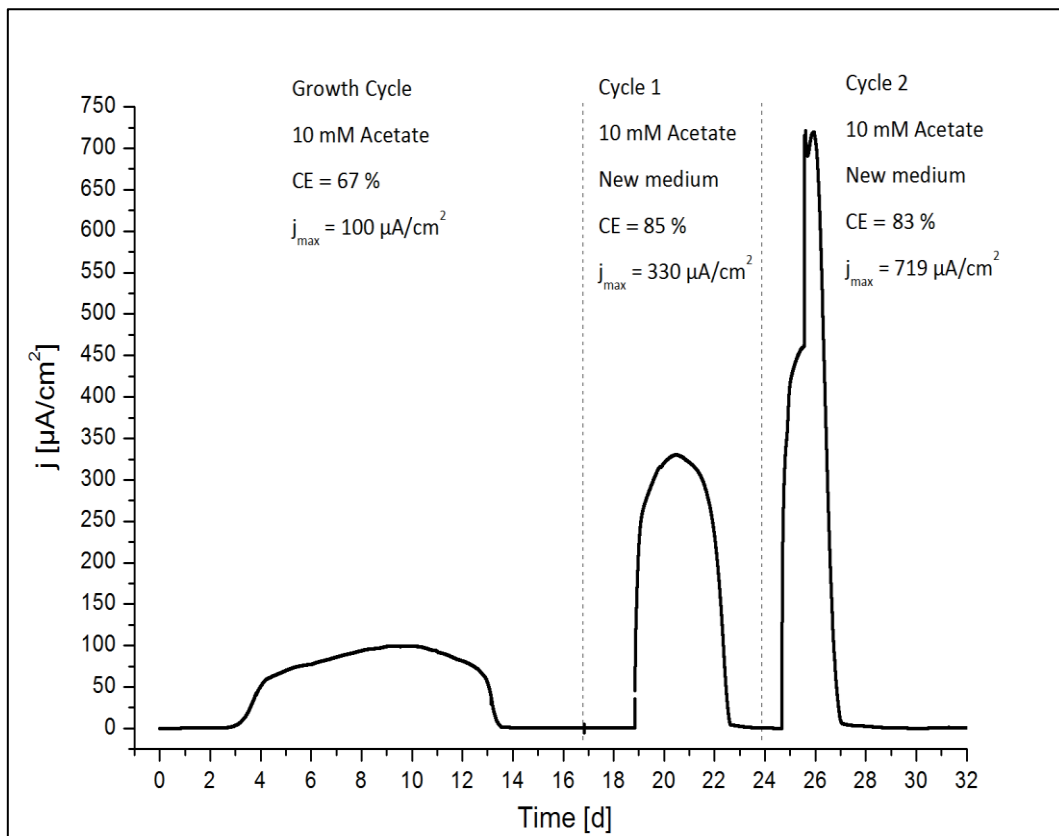


Figure 11: Laboratory trials using 10 mM acetate as the substrate (courtesy of A. Baudler, 2012, unpublished). The medium was exchanged after each cycle. The maximum current density ( $j_{max}$ ) the corresponding Coulombic efficiency (CE) is shown.

Cycle 1 and Cycle 2, as shown in Figure 11, show similar CE values, 85 % and 83 % respectively, but they have very different  $j_{max}$  values. Cycle 2 has a  $j_{max}$  value of 719  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  which is more than double that cycle 1's at 330  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ . Cycle 1 had a high CE value but showed medium activity level resulting in a medium  $j_{max}$ . The same can be said of CE value determined for cycle 2 but not the  $j_{max}$  value. Cycle 2's  $j_{max}$  may be higher due to increasing biofilm thickness i.e. with more microorganisms utilising the available substrate more quickly. The similar CE values are not an indication of the biofilm reach a steady state which should require additional cycles (Liu, *et al.*, 2011). Cycle 1's  $j_{max}$  was significantly lower and cycle 2's  $j_{max}$  is slightly lower than the maximum values reported for an operating temperature of 35 °C which was over 800  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  but also after more than 3 cycles total (Patil, *et al.*, 2010).

### 4.3. Prototype Trials using Synthetic Wastewater

The experiments with synthetic wastewater using acetate as substrate at prototype scale were performed in two series composed of biofilm growth cycle and three regular cycles. They were not duplicates instead the geometric electrode area was reduced from 6654 cm<sup>2</sup> to 4436 cm<sup>2</sup> from the first to second prototype run, respectively. The second change was to use a substrate spike in the second regular cycle in the second run as opposed to always exchanging the medium, as was done in the first trial run.

The results of the first prototype run using 100 L of 10 mM acetate as a substrate are shown in *Figure 12*. The medium was exchanged after every cycle. The Coulombic efficiency (CE) and the maximum current density ( $j_{\max}$ ) are also shown, additionally please note that the cycles 1 and 2 of the first run were performed in both fed-batch and closed-loop modes. The first peak of both cycles is from the fed-batch mode and the second peak is from closed-loop mode. The initial biofilm growth cycle, in *Figure 12*, has the lowest  $j_{\max}$  value of 41.4  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ . This is to be expected because the biofilm was not fully developed. Looking at the development of  $j_{\max}$  and CE over the remaining cycles, as shown in *Figure 12*, the following trends were observed:

- $j_{\max}$ : cycle 1: 92.3 > cycle 2: 86.4 > cycle 3: 71.5  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ .
- CE: cycle 1: 36 % > cycle 2: 33 % > cycle 3: 30 %.

Based on the two trends shown above, both  $j_{\max}$  and CE are dependent on the length of the experiment with  $j_{\max}$  and CE decrease from cycle 1 to cycle 3. The decrease in the  $j_{\max}$  values can be translated to a drop in activity of the EAB in the biofilm or that other forms of microbial activity began to use up more acetate than the EAB on the electrode. This seems plausible because of the accumulation of biomass in the system apart from on the surface of the anode, see section xx: Influence of Residual Biomass. In terms of  $j_{\max}$  value the opposite trend was observed to the development of  $j_{\max}$  during laboratory experiments. Also CE values

decreased here where in the laboratory experiments they seemed to remain constant after 2 cycles.

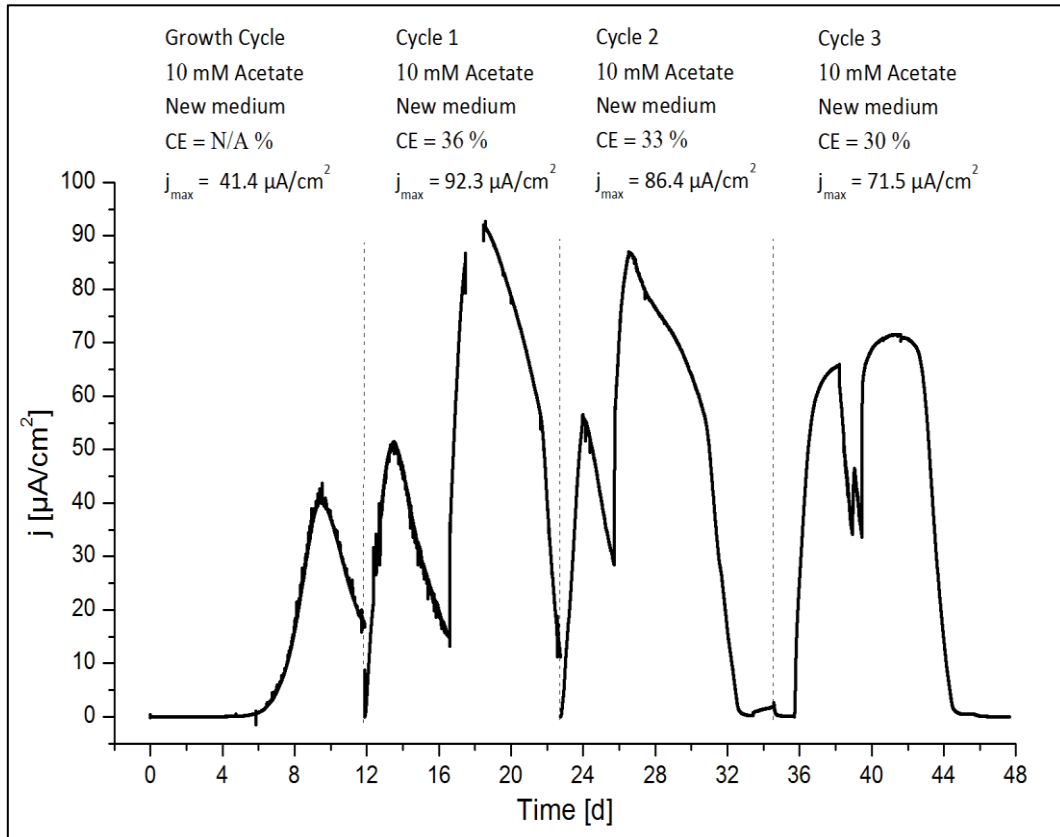


Figure 12: First prototype run using 10 mM acetate as the substrate and with the medium being exchanged at the beginning of each cycle. The Coulombic efficiency (CE) and the maximum current density ( $j_{max}$ ) are also listed for each cycle.

The results of the second prototype run using both 10 mM and 20 mM acetate as the substrate are shown *Figure 13* together with the corresponding Coulombic efficiency (CE) and maximum current density ( $j_{max}$ ). The biofilm growth cycle had the lowest  $j_{max}$  value of  $54.4 \mu A/cm^2$ . As mentioned above, this is well within the expected results. Cycles 1 and 3, shown in *Figure 13*, have different trends in comparison to those of the first run. Cycle 2 can be neglected for the trend analysis because it seems that spiking acetate, in comparison to exchanging the whole medium, impaired bioelectrochemical activity. The development trends based on the results from cycle 1 and 3 in terms of  $j_{max}$  and CE are listed below:

- $j_{max}$ : cycle 3: 114 > cycle 1:  $86.4 \mu A/cm^2$ .
- CE: cycle 3: 41 % > cycle 1: 30 %.

The resulting trends for  $j_{\max}$  and CE, for the second run, show the opposite development from those of the first run. One can see that the cycle 3 had the highest  $j_{\max}$  and  $\eta$  values as opposed to cycle 1 in the first run. Cycle 1 has lower values than cycle 3. The resulting trends gained from the second prototype run indicate two things when compared to the trends from the first run:

- Using a higher acetate concentration of 20 mM results in higher  $j_{\max}$  and CE values.
- Adding inoculum to each new cycle when medium was exchanged leads to a positive trend.

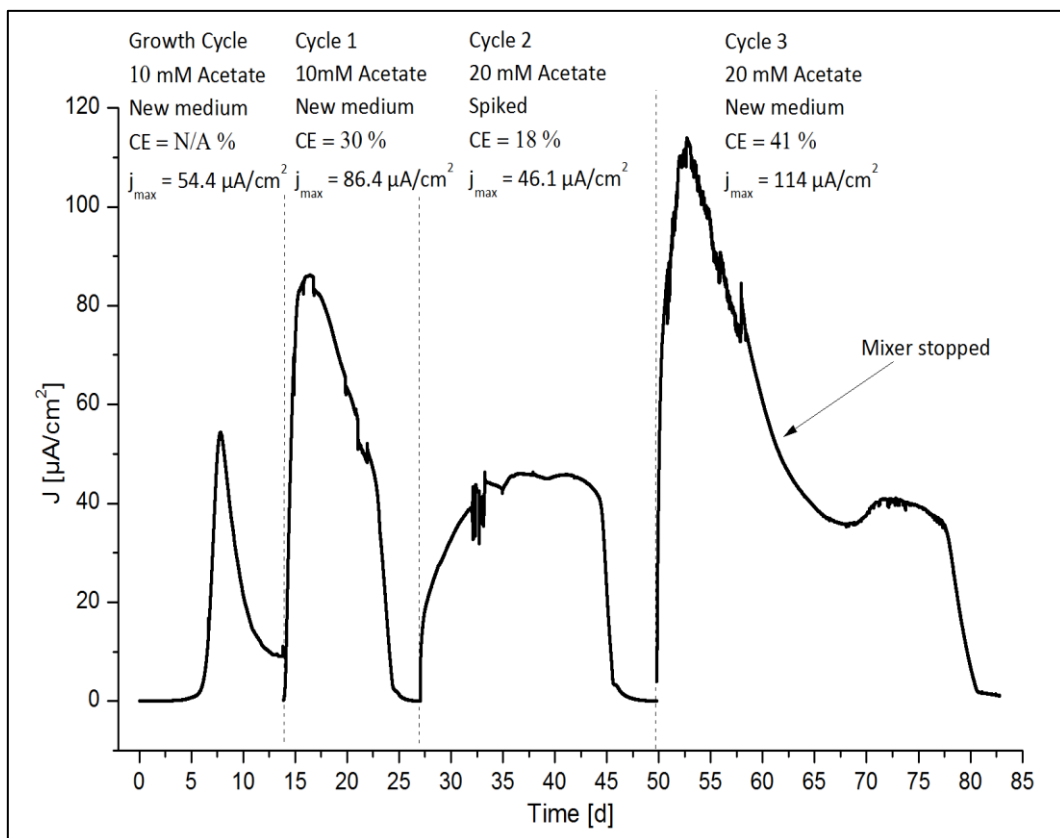
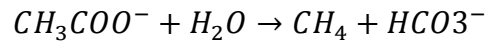


Figure 13: Second prototype run using acetate as substrate. The growth cycle and cycle 1 - 3 are shown with corresponding substrate concentration, the Coulombic efficiency ( $\eta$ ), maximum current density ( $j_{\max}$ ) and if the medium was exchanged or not. Inoculum was added each time the medium was exchanged.

Although in terms of increasing  $j_{\max}$  one should take the results with a “grain of salt” because the substrate was doubled and as such one would expect an increase of the  $j_{\max}$  value of around a factor 2 which is not the case.  $j_{\max}$  increased by a factor of 1.32. This can be attributed to the far from optimal reactor configuration in which

the non-electroactive planktonic microorganisms continually grow as well. Such organisms could use a methane producing fermentation according to the following simplified reaction equation:



Coulombic efficiency did not increase significantly with increasing acetate concentration, an increase of ca. 10 % was determined, although 40 % CE using 20 mM acetate was more charge/current flow than 40 % CE using 10 mM acetate. This could be because the biofilm was not yet fully developed (Liu, *et al.*, 2011) and energy was being used for biomass production. Exchanging the medium and the buffer solution in the cathode chamber after each cycle is important because as shown below in *Table 7* the pH value shifted in both chambers from the starting value of 7 to 6 in the anode chamber and to 12 in the cathode chamber. This pH shift has been identified as a limiting factor of electricity production in MFCs (Rozendal, *et al.*, 2007), and also explains the lower  $j_{max}$  and CE determined for cycle 2.

*Table 7: After each cycle using synthetic wastewater the pH was measured in the anode and cathode chamber. Average values and standard deviation are given below.*

|            |                 |
|------------|-----------------|
| pH Anode   | 6 ± 0,2 (n = 5) |
| pH Cathode | 12 ± 0.9 (n=6)  |

#### 4.4. Screening: Real wastewater at laboratory scale

Real wastewater samples were screened to determine which would be the most promising for use in prototype trials. The results of the screening are shown in *Table 8*. Five different wastewater samples were tested and the one with the highest maximum current density ( $j_{max}$ ) was selected for prototype trials. The communal wastewater “effluent after pre-treatment” (EAPT) was selected for prototype trials because it had the highest  $j_{max}$  value, of 142.2  $\mu A/cm^2$ , which was 14 times higher

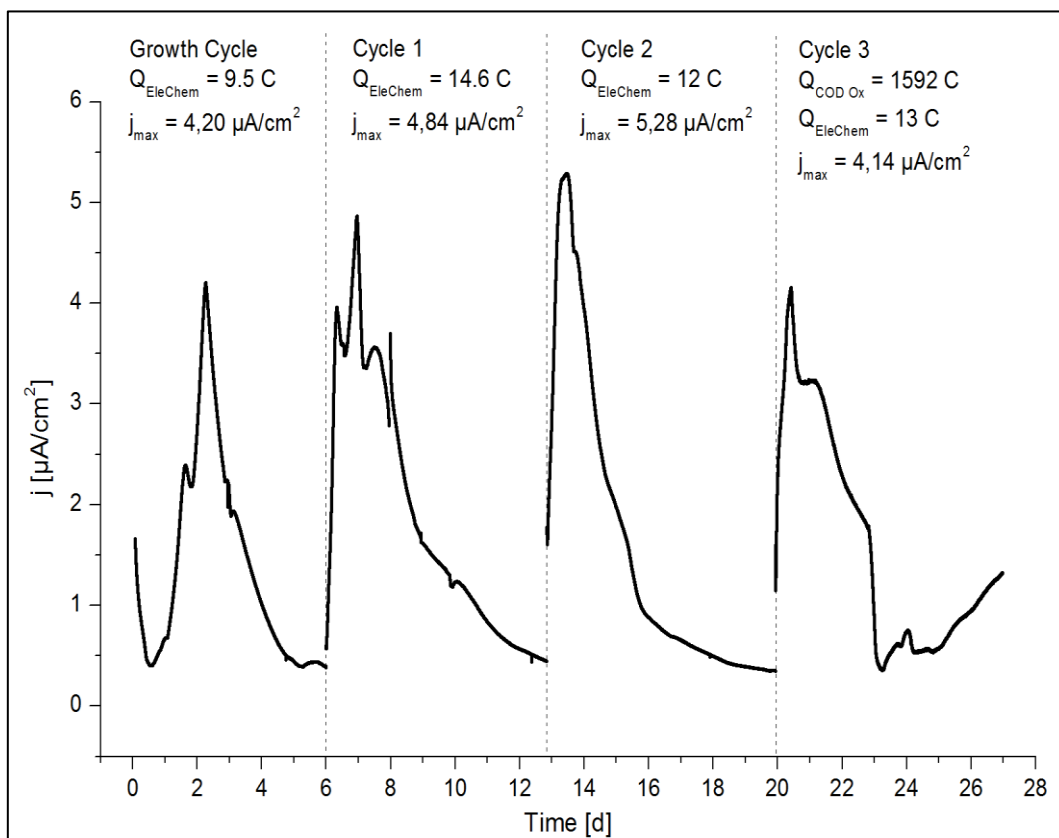
than the second highest  $j_{\max}$  value of “yellow water” of  $9.02 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . The remaining waste samples were only tested for bio-electrochemical activity at laboratory scale.

The  $j_{\max}$  values are listed in *Table 8* together with results from the chemical analysis and as one can see EAPT has the highest  $j_{\max}$  but the lowest, 4 to 10 times lower, chemical oxygen demand (COD). As one can see high COD values are not necessarily a prerequisite (Heidrich, *et al.*, 2011) for high  $j_{\max}$  values as was the case with centrate pre-digestion,  $5421 \text{ mg O}_2/\text{L}$ , and centrate post-digestion,  $2106 \text{ mg O}_2/\text{L}$ . The corresponding  $j_{\max}$  values were 4.98 and 1.31 respectively. Instead it is more the nature of the compounds in the wastewater e.g. “yellow water” has a high  $\text{NH}_4^+/\text{TKN}$  content of  $4580/5832 \text{ mg NH}_4\text{-N}/\text{L}$ . This kind of wastewater can be used in a BES (Ieropoulos, *et al.*, 2012) but not as good as e.g. EAPT with only  $187.5/\text{mg NH}_4\text{-N}/\text{L}$ . High  $\text{R}_3\text{N}$ , i.e. TKN, and  $\text{NH}_4^+$  are difficult to deal with because they require organic carbon to be present in order to degrade these compounds or eliminate them from the wastewater. In the case of communal wastewaters it seems that EAPT is best suited for use in BES.

*Table 8: Results from the screening the real wastewater for prototype trials. COD: Chemical oxygen demand, O: Original sample (not pre-treated), TKN: total Kjeldahl nitrogen, Maximum current density ( $j_{\max}$ ) from the biofilm growth cycle and first regular cycle.*

| Wastewater                   | COD (O)<br>[mg O <sub>2</sub> /L] | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /TKN [mg<br>NH <sub>4</sub> -N/L] | pH (before tests) | $j_{\max}$ [ $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ] |
|------------------------------|-----------------------------------|--|-------------------|--|
| Centrate Pre-digestion       | 5421                              | 63.0/410.3   | 5.57              | 4.98                                     |
| Centrate Post-digestion      | 2106                              | 1026/1440  | 8.38              | 1.31                                     |
| Yellow Water                 | 5160                              | 4580/5832  | 9.41              | 9.02                                     |
| Effluent After Pre-treatment | 497                               | 82.2/187.5   | 7.22              | 142.2                                    |
| Wolters Brewery              | 5000                              | 14.2/68.5  | 9.85              | 5.28                                     |

Wolters brewery wastewater was also analysed in terms of chemical composition, see *Table 8*, and bioelectrochemical activity. The results of the chronoamperometric measurements are shown in *Figure 14* together with the calculated  $j_{\max}$  values of each cycle and the total charge ( $Q_{\text{EleChem}}$ ) which passed through the potentiostat. The theoretical charge ( $Q_{\text{COD Ox}}$ ), which could have been gained from COD reduction, is listed for cycle 3 and is in the order of what was expected (Heidrich, *et al.*, 2011). The highest  $j_{\max}$  value,  $5.28 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ , was determined for cycle 2 and the highest  $Q_{\text{EleChem}}$  value,  $14.6 \text{ C}$ , was measured in cycle 1.  $j_{\max}$ , averaging  $4.62 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ , and  $Q_{\text{EleChem}}$ , averaging  $12.3 \text{ C}$ , values are low.



*Figure 14: Chronoamperometry results using Wolters brewery wastewater.  $j_{\max}$ : maximum current density,  $Q_{\text{EleChem}}$ : total charge measured with the potentiostat,  $Q_{\text{COD Ox}}$ : theoretical charge which can be gained from COD reduction, COD: chemical oxygen demand.*

This can be explained by the complex nature of brewery wastewater which is the waste product of beer production. One can see the indications of 5 different substrate usages in the growth cycle, cycle 2 and cycle 3, whereas cycle 1 only has indications of two substrates being used. In order for the biofilm to utilise the available substrates in this wastewater it would need to be either composed of few



species capable of switch their metabolisms to utilise different substrates or of many different species working in concert to use the substrates. Both scenarios are possible and it seems there is potential for much higher energy gain from the system.

This was indicated at by the theoretical charge,  $Q_{\text{COD Ox}}$ , of 1592 C which could be gained from the COD reduction which was measured for cycle 3 and the resulting theoretical charge is shown in *Figure 14*. If this charge could be used at a Coulombic efficiency (CE) of 40 % it would yield a theoretical  $j_{\text{max}}$  of  $78.4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  in the same time period of 7 days which is similar to values gained using acetate as a substrate at prototype scale at a similar CE. The other major setback of this beer brewery wastewater is the high pH value of 9.5. This is inhibiting for microorganisms derived from primary wastewater (Wong-Chong, et al., 1983) which was used as the inoculum.

As explained above “effluent after pre-treatment” (EAPT) proved to be the communal wastewater best suited for prototype trials. The results of the laboratory trials are shown in *Figure 15*. EAPT showed the highest  $j_{\text{max}}$  value of  $142.2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ , although it is unusual that it was measured for the growth cycle.  $J_{\text{max}}$  decreased from  $142.2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  during the growth cycle to  $50.3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  during cycle 3. This coincided with an increase in  $Q_{\text{EleChem}}$  from 255.9 C for the growth cycle to 302.9 C for cycle 3. However this trend was not consistent since  $Q_{\text{EleChem}}$  decreased first to 244.6 C for cycle 1 and then increased to the highest value of 393.3 C for cycle 2. This could be explained by the biofilm aging process whereby the mixed population begins to utilise different substrates over time as opposed to one substrate quickly.  $Q_{\text{COD Ox}}$  was determined for cycle 2, 3 with 586.2 C, resulting in a CE of 67.1 % and 101.3 %, respectively.

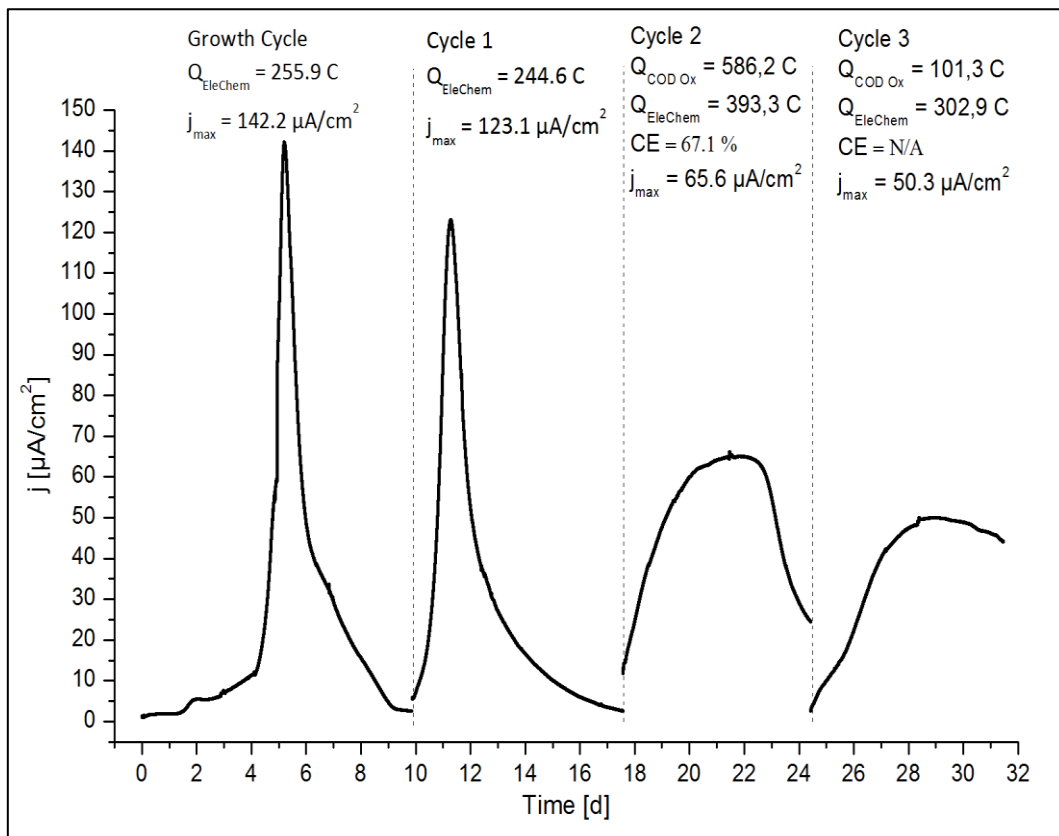


Figure 15: Results of the chronoamperometric measurements using „effluent after pre-treatment“ (EAPT) as the substrate. The charge ( $Q_{\text{EleChem}}$ ) calculated from the measured current,  $j_{\text{max}}$ , theoretical current ( $Q_{\text{COD Ox}}$ ) from COD reduction and Coulombic efficiency (CE) are also shown.

This seems odd at first as one would expect  $Q_{\text{COD Ox}}$  to be related to  $Q_{\text{EleChem}}$  where similar values of the one would produce similar values of the other. One can see that the  $Q_{\text{EleChem}}$  values for both cycles were similar with a difference of 33 % however the  $Q_{\text{COD Ox}}$  values and therefore the COD reduction differed by 83 %. Both cycles were terminated after 7 days run time in order to gauge COD reduction per d which resulted in an average COD reduction rate of  $20.2 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}\text{d}^{-1}$  for COD (O) over 7 days. The development of the cycles over the given time showed that cycle 2 was nearly finished and cycle 3 was not. It could be possible that COD reducing activities occur in the end stage of the cycle i.e. after  $j_{\text{max}}$  has been reached. As such this would explain why COD reduction and corresponding  $Q_{\text{COD Ox}}$  were much lower than one would expect from the determined  $Q_{\text{EleChem}}$  value. This corresponds to the basic idea that microorganism use easily available energy sources first and then begin to utilize the remaining substrates. However with only the results of one experiment further research should be done to find out if this is true or not.

#### 4.5. Results of the trials with real wastewater at prototype scale

“Effluent after pre-treatment” (EAPT) was tested at prototype scale over a period of 64 days at an operating temperature of  $23.7 \pm 0.5$  °C ( $n = 6$ ). The electrode surfaces were not cleaned and as such the acetate biofilm from the previous trials was used to test EAPT. Before the first cycle, EAPT was put through an acidification process to increase the amount of low chain substrates to ease the transition of the acetate biofilm to EAPT usage, see section 3.6. Acidification to Increase Organic Acid Content. This was done for 6 days under anaerobic conditions at 35 °C and is denoted as “Acidification, 35 °C” in the following figures. The organic acid content however did not increase instead it decreased from 149.2 [mg CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>/L] to 3.31 [mg CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>/L] which was unfortunately the exact opposite of what was aimed at. Furthermore this observation was compounded by the pH measurements which showed increase pH during the acidification step.

The results of the CA measurements are shown in *Figure 16* for cycle 1 after anaerobic acidification and cycle 2 without acidification together with the resulting maximum current densities ( $j_{\max}$ ) for each section. Cycle 1 and cycle 2 both showed their  $j_{\max}$  values at the beginning of the cycle. The  $j_{\max}$  values were 45.6  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  and 45.4  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ , respectively. Both cycles showed the same development trend in that they decrease from their highest values relatively quickly and then pan out with smaller activity peaks visible in cycle 2 after 50 days. The secondary activity peaks were not necessarily the result of different substrates being used. Instead longer chain molecules, for example, could have been broken down without electrons being transferred to the electrode. After which new short chain molecules were metabolised and electrons were then transferred to the electrode. Coulombic efficiencies (CE) could not be determined for the cycles, not including spiking, using EAPT as the medium because  $Q_{\text{EleChem}} \gg Q_{\text{COD Ox}}$  therefore yielding a CE value over 100 %. A possible explanation could be the usage of stored energy gained from previous experiments using acetate as the substrate. This idea is explained in section 4.1. Influence of Residual and Accumulated Biomass.

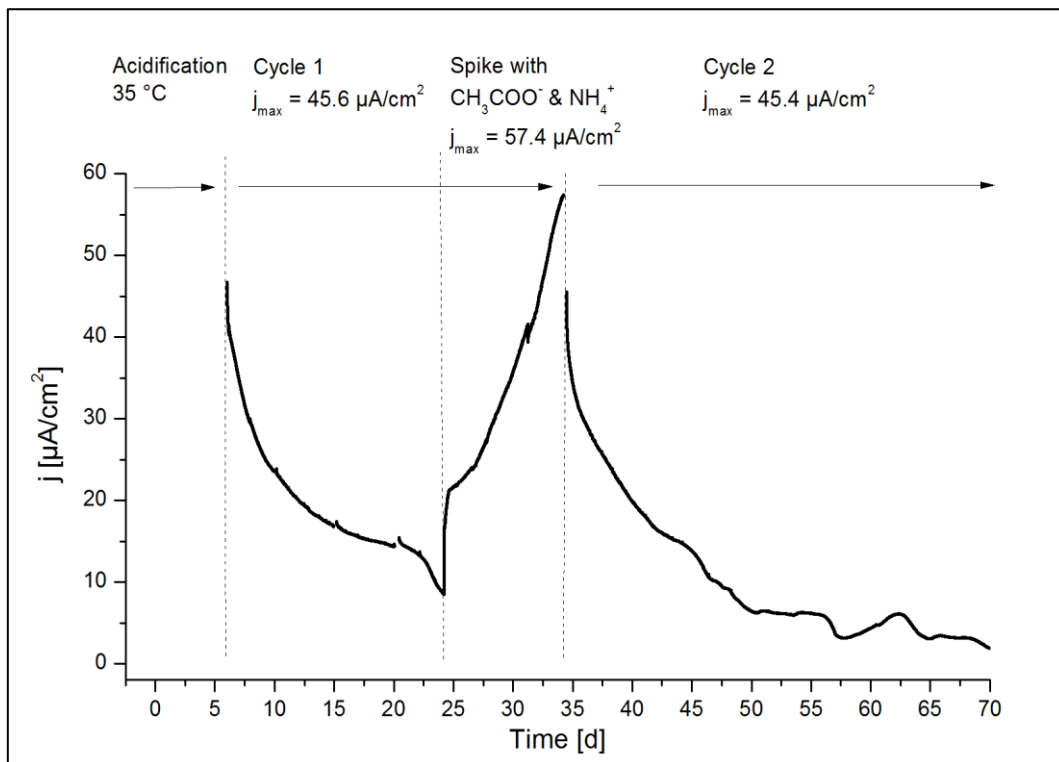


Figure 16: Results of the CA measurements given as current density ( $j$ ) using "effluent after pre-treatment" (EAPT) as substrate over 64 days with a 6 day anaerobic acidification of EAPT at 35 °C before cycle 1. EAPT was exchanged for cycle 2 without pre-acidification. Additionally in cycle 1 the medium was spiked with acetate and ammonium. Maximum current density ( $j_{max}$ ) values are listed for each section.

The results of the chemical oxygen demand (COD) and current density measurements for a period of 180 min after spiking the medium on day 24 are shown in Figure 17 together with the COD value, ammonium concentration ( $[NH_4^+]$ ), pH value and conductivity after 150 min. The medium was spiked to see if the majority of the generated current resulted from the usage of acetate or similar compounds i.e. if a substrate limitation occurred or not. This assumption proved to be correct because as one can see current generation increased immediately up to a  $j_{max}$  of 57.4  $\mu A/cm^2$ . The immediate response of the biofilm to increased acetate levels shows the importance of grown a biofilm which is used to the substrates it is provided with, in this case to the detriment of EAPT utilisation because the biofilm was grown on acetate.

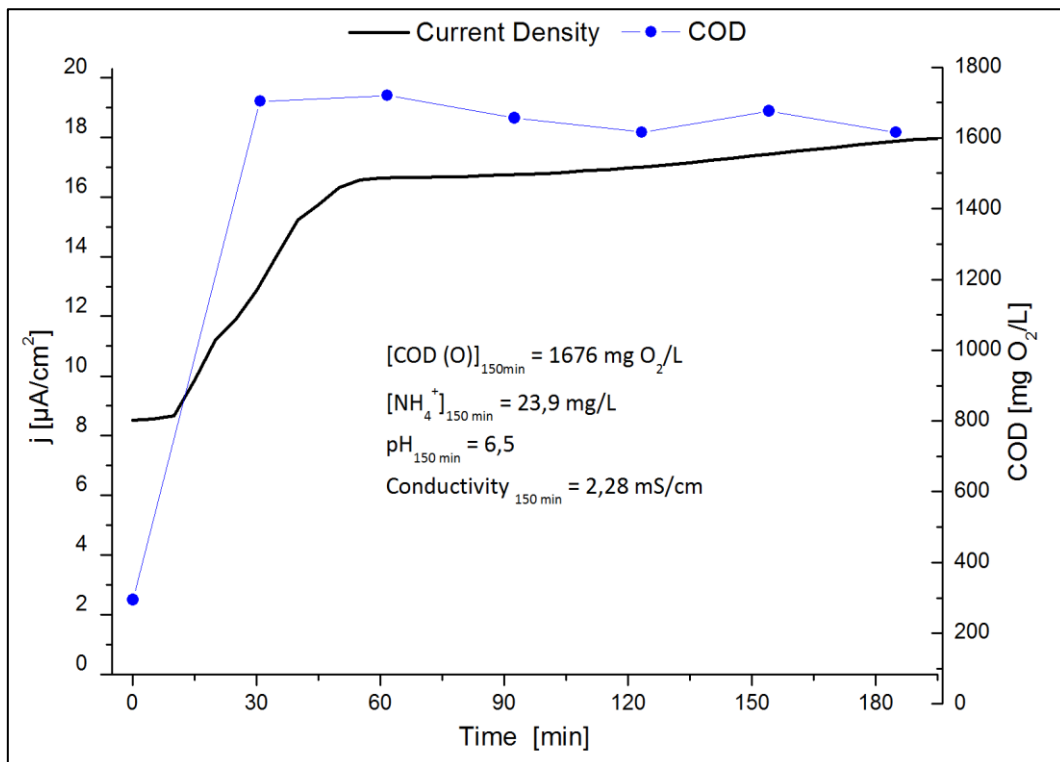


Figure 17: Results of chemical oxygen demand (COD) and current density ( $j$ ) measurement after spiking the medium with acetate and ammonium.

After reaching a current density of  $57.4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  the cycle was stopped and the medium exchanged so  $j_{\text{max}}$  could have been higher if the experiment was run longer. As one can see the spiked acetate was distributed evenly in the system after around 60 min this is shown by the development of the COD values. It can therefore be assumed that the flow characteristics in the prototype are those of a plugged-flow system and therefore diffusion kinetics can be disregarded as is the case with the laboratory scale experiments. The experimental details are given in section 3.X Spiking with acetate and ammonium.

Conductivity and pH were monitored in the prototype experiments and the results are shown in Figure 18 parallel to the development of the current density. The conductivity of EAPT had an even development trend with no noticeable spikes or other irregularities. It increased during the acidification step and after spiking which is to be expected because in both cases more organic substances were present in terms of the molecules which increase the ionic strength. During the acidification, cycle 1 after spiking and cycle 2 the conductivity increased from  $1.37 \text{ mS}/\text{cm}$  to  $1.53 \text{ mS}/\text{cm}$  then decreased to  $0.72 \text{ mS}/\text{cm}$  then with the spike increased to  $2.28 \text{ mS}/\text{cm}$

then decreased to 1.44 mS/cm and at the beginning of cycle 2 decreased from 1.35 mS/cm to 0.76 mS/cm. The decreases measured during the cycles and after spiking in cycle 1 were expected due to the process of organic substances being degraded by the microorganisms. The pH value of EAPT increased during the acidification step and after spiking with acetate and was highest (cycle 1: 6.78 and cycle 2: 6.86) at the beginning of each cycle it then decreased towards then end of the cycle to a value of 6.17, cycle 1, and 5.96, cycle 2, while the pH of the cathode chamber increased from 7 to  $12 \pm 0.9$  ( $n = 6$ ) similar developments were reported by Rozendal *et al.*, 2006 and Harnisch *et al.*, 2008.

Each of the trends which were described for pH and conductivity development over the prototype trials seems reasonable when looked at individually. However when considered together both trends are at odds with one another. One would expect decreasing pH to be equivalent to an increase in the concentration of ionic species thus correlating to increasing not decreasing conductivity. Looking closer at the pH one can see that the trend is not as smooth as that of the conductivity trend with a multitude of slope changes both increasing and decreasing values this may be a result of ionic transport of e.g.  $\text{Na}^+$  and  $\text{OH}^-$  between the cathode and anode (Harnisch & Schröder, 2009). This together with the assumption that the majority of the conductivity results from organics like acetate which are consumed would explain why the conductivity decreases constantly after the acidification step regardless of pH value development.

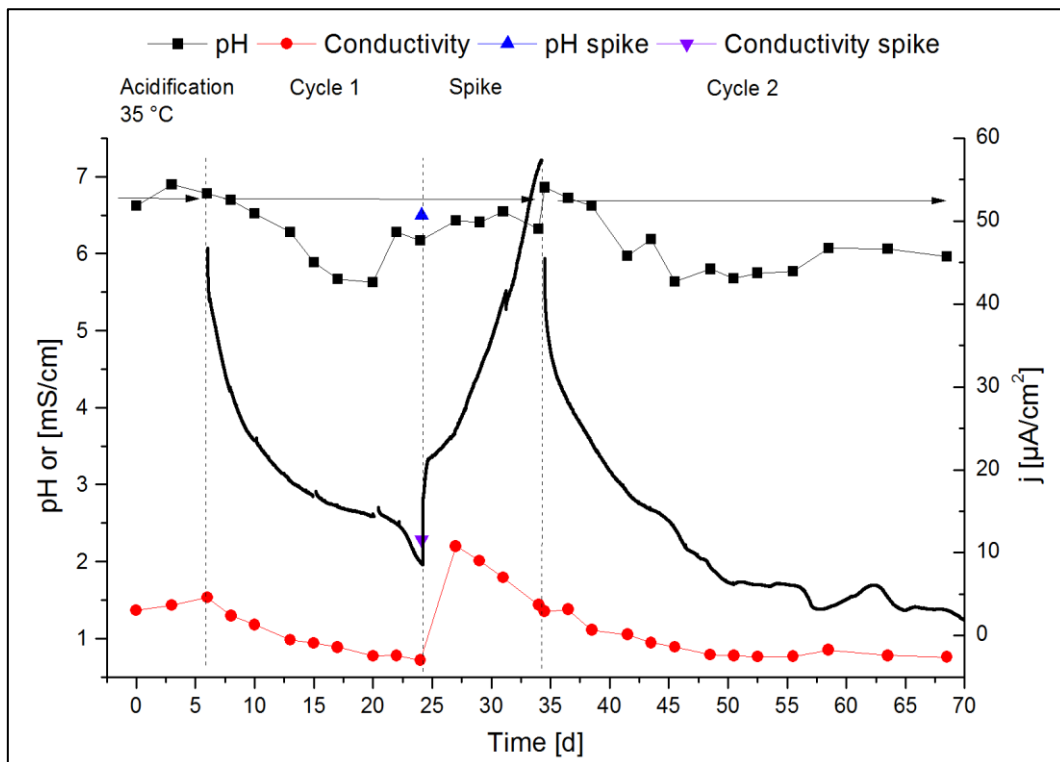


Figure 18: The development of pH and conductivity in the bulk solution of the anode side during the prototype scale trials.

Phosphorus availability is one of the limiting factors for microbial growth therefore it was also monitored in the prototype trials. Phosphorus content was measured as  $H_xPO_4^{(3-x)}$  ( $PO_4$ -P) content and total phosphorus (Tot. P), including organic phosphorus. The results of these measurements are shown in Figure 19 over a period of 64 days. Tot. P and  $PO_4$ -P showed the same development trends in both cycles apart from the acidification step where Tot. P concentration remained near to constant and  $PO_4$ -P increased which indicates that organic phosphorus was converted to o-phosphate. After the acidification step, the difference between Tot. P and  $PO_4$ -P remained nearly constant over cycle 1 and 2 except for the last measurement after spiking and 3 measurements in cycle 2. This indicates that Tot. P is mostly dependent on  $PO_4$ -P concentration and not on the organic phosphorus content.  $PO_4$ -P increased or decreased during the prototype trials i.e. in cycle 1 and 2 this can be explained by phosphate cross-over from and to the cathode chamber (Harnisch & Schröder, 2009). Increasing or decreasing  $PO_4$ -P concentration is dependent on relative charge gradients between anode and cathode chamber therefore both decreases and increases are possible. Also decreases can occur because of microbial assimilation whereas dissimilation should lead to an increase

in Tot. P without an increase of  $\text{PO}_4\text{-P}$ . This situation was measured on the last day of cycle 1 after spiking.

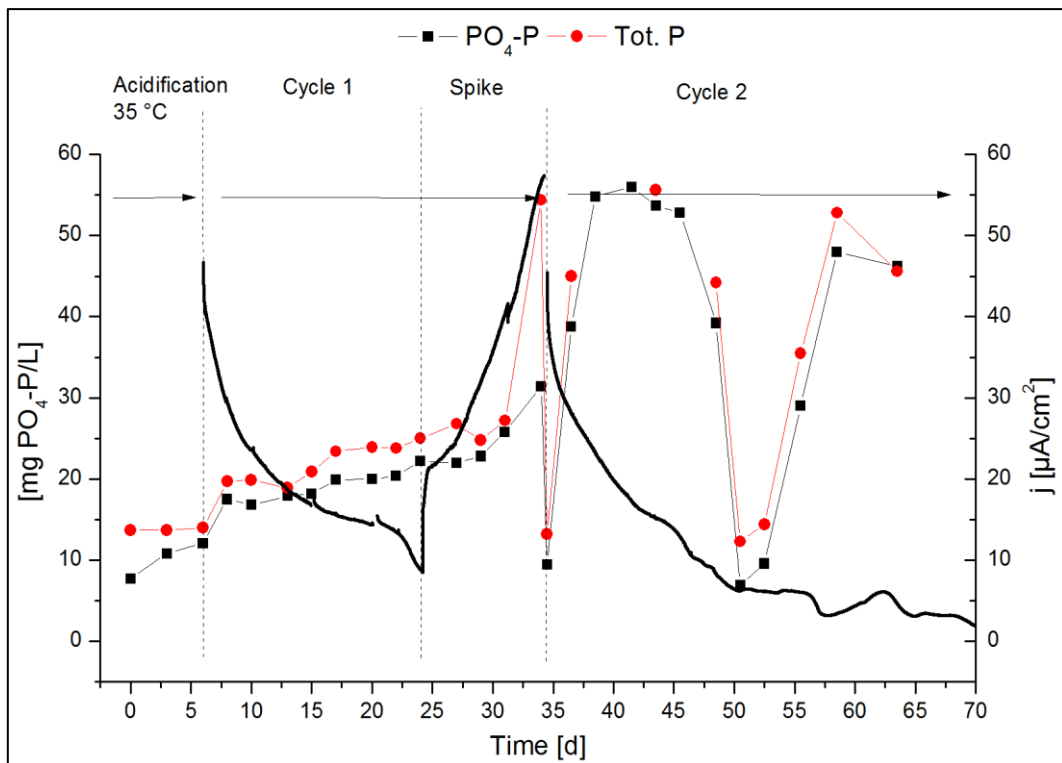


Figure 19: Results of the phosphorus measurements for the prototype trials.  $\text{PO}_4\text{-P}$ : soluble  $\text{H}_2\text{PO}_4(3-x)^-$  species. Tot. P: total phosphorus.

Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) and total Kjeldahl nitrogen (TKN) were measured over a period of 70 days during the acidification step, prototype cycles 1 and cycle 2 because nitrogen elimination is an important part of the wastewater treatment process. The results of the  $\text{NH}_4^+$  and TKN measurements are shown in Figure 20 parallel to the development of the current density.  $\text{NH}_4^+$  concentration increased from 61.8  $\text{mg NH}_4\text{-N/L}$  to 74.1  $\text{mg NH}_4\text{-N/L}$  during acidification whereas TKN remained almost constant at an average of 78.3  $\text{mg NH}_4\text{-N/L}$  this indicates that TKN was converted to  $\text{NH}_4^+$ . During cycle 1, after spiking and cycle 2  $\text{NH}_4^+$ /TKN concentration decreased constantly from the initial maximum values of 74.1/78.6  $\text{mg NH}_4\text{-N/L}$  to the last measured values of 10.8/18.3  $\text{mg NH}_4\text{-N/L}$ , 23.9/30.9  $\text{mg NH}_4\text{-N/L}$  to 15.2/29.4  $\text{mg NH}_4\text{-N/L}$  and 63.6/85.5  $\text{mg NH}_4\text{-N/L}$  to 8.8/13.5  $\text{mg NH}_4\text{-N/L}$ . The difference between TKN and  $\text{NH}_4^+$  concentration remained similar in cycle 1 and cycle 2, after 7 days, at a value of 7.1  $\text{mg NH}_4\text{-N/L}$  which indicates that the conversion of organic N to  $\text{NH}_4^+$  is limited by the concentration of organic N because after reaching the



average difference it did not decrease further even after spiking with acetate which means conversion is not limited by organic carbon availability. Depletion of  $\text{NH}_4^+$  from the anode chamber is based on the mobility of the cation and its ability to cross through the CEM to the cathode chamber where at alkaline pH is converted to  $\text{NH}_3$  and can leave the cathode chamber as gaseous  $\text{NH}_3$  as shown by Kuntke *et al.*, 2011 and Desloover *et al.*, 2012.  $\text{NH}_3$  concentration was measured in the cathode chamber after cycle 1 at a value of 3000 mg  $\text{NH}_4\text{-N/L}$  and gaseous ammoniac was smelled at the gas outlets of the anode chamber.

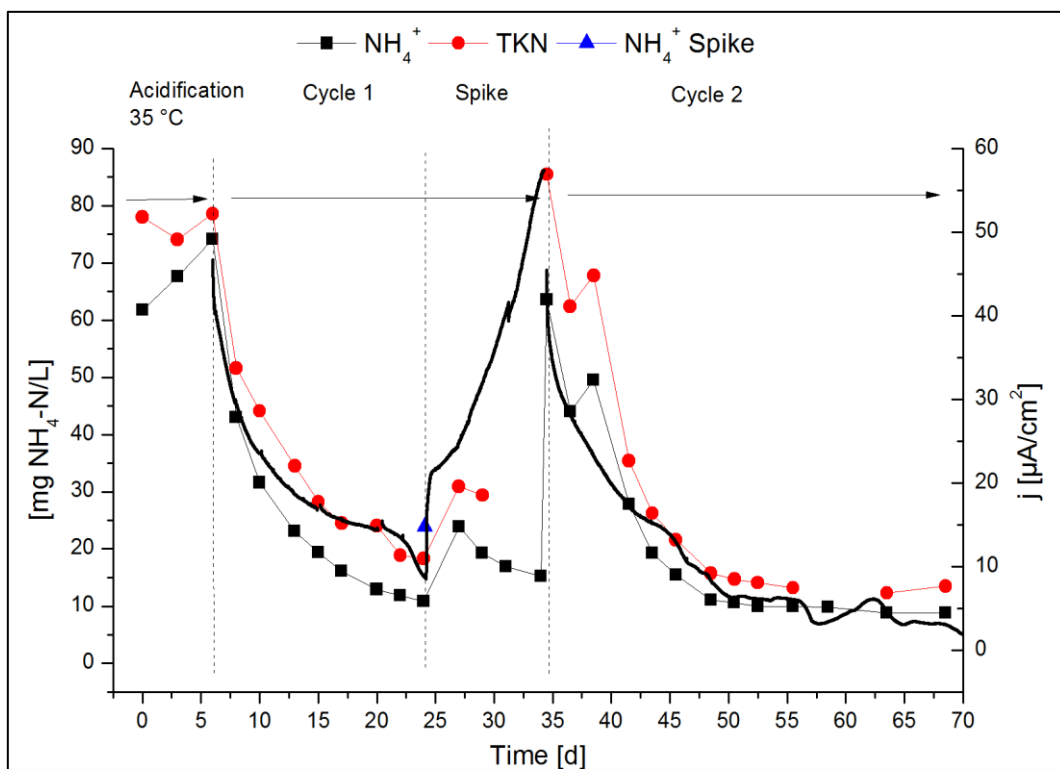


Figure 20: Results of the ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) and total Kjeldahl nitrogen (TKN) measurements over a period of 70 days shown parallel to the development of the current density ( $j$ ).

The results of the measurements of and the development of the chemical oxygen demand (COD) and total suspended solids (TSS) are shown in *Figure 21* parallel to the development of the current density ( $j$ ). During the acidification step COD (O) and TSS decreased from 1074 mg  $\text{O}_2/\text{L}$  and, 543 mg/L to 809 mg  $\text{O}_2/\text{L}$  and 11.5 mg/L, respectively. This can be explained by sedimentation/settling in the anaerobic containers because both TSS and, COD (O) increased again to 920 mg  $\text{O}_2/\text{L}$  on day 8 and, 237 mg/L on day 8 after EAPT was put into the prototype and therefore re-mixed. COD (f) increased during the acidification from 366 mg  $\text{O}_2/\text{L}$  to 624 mg  $\text{O}_2/\text{L}$

which would mean that although the amount of acetate equivalent organic acids, specifically, did not increase the amount of particles smaller than 0.45  $\mu\text{m}$  and water soluble compounds, generally, increased.

After EAPT was introduced into the prototype the COD (O) and (F) values increased further on day 10 to 935 mg  $\text{O}_2/\text{L}$  and 712 mg  $\text{O}_2/\text{L}$ , respectively. After this all three parameters showed the same general development trends i.e. a steady decrease to the final values at the end of each cycle i.e. before the substrate spike in cycle 1 and at the end of cycle 2. The final COD (O), COD (F) and, TSS values before the spike in cycle 1 were 295 mg  $\text{O}_2/\text{L}$ , 229 mg  $\text{O}_2/\text{L}$  and 40 mg/L, respectively, resulting in a net decrease over 16 days, without acidification and spiking, of COD (O) by 39.1 mg  $\text{O}_2/\text{L}^*\text{d}$ , of COD (F) by 20.1 mg  $\text{O}_2/\text{L}^*\text{d}$  and of TSS by 12.3 mg/L\*d. Cycle 2 showed higher COD (F) and lower COD (O) initial values than the EAPT sample used in the acidification step followed by cycle 1 with a COD (O) of 975 mg  $\text{O}_2/\text{L}$  and a COD (F) of 802 mg  $\text{O}_2/\text{L}$ . The final values measured in cycle 2 are not consistent with the development trend and as such net COD reduction is calculated based on the second last set of values on day 58 resulting in a net reduction over 24 days of COD (O) by 33.2 mg  $\text{O}_2/\text{L}^*\text{d}$  and of COD (F) by 27.2 mg  $\text{O}_2/\text{L}^*\text{d}$ . The average COD reduction rates were 36.2 mg  $\text{O}_2/\text{L}^*\text{d}$  for COD (O) and 23.7 mg  $\text{O}_2/\text{L}^*\text{d}$  for COD (F). TSS was not measured after the spiking in cycle 1 because it follows the same trend as COD (O) including all irregularities and can be assessed by the difference between COD (O) and COD (F) which in both cycles becomes smaller as the cycles progressed. The spike like increases, which can be seen in *Figure 21*, in both cycle 1 and 2 can be explained through dissimilation of organic matter from biomass in the system or detachment of said biomass, as explained in connection with *Figure 10*.

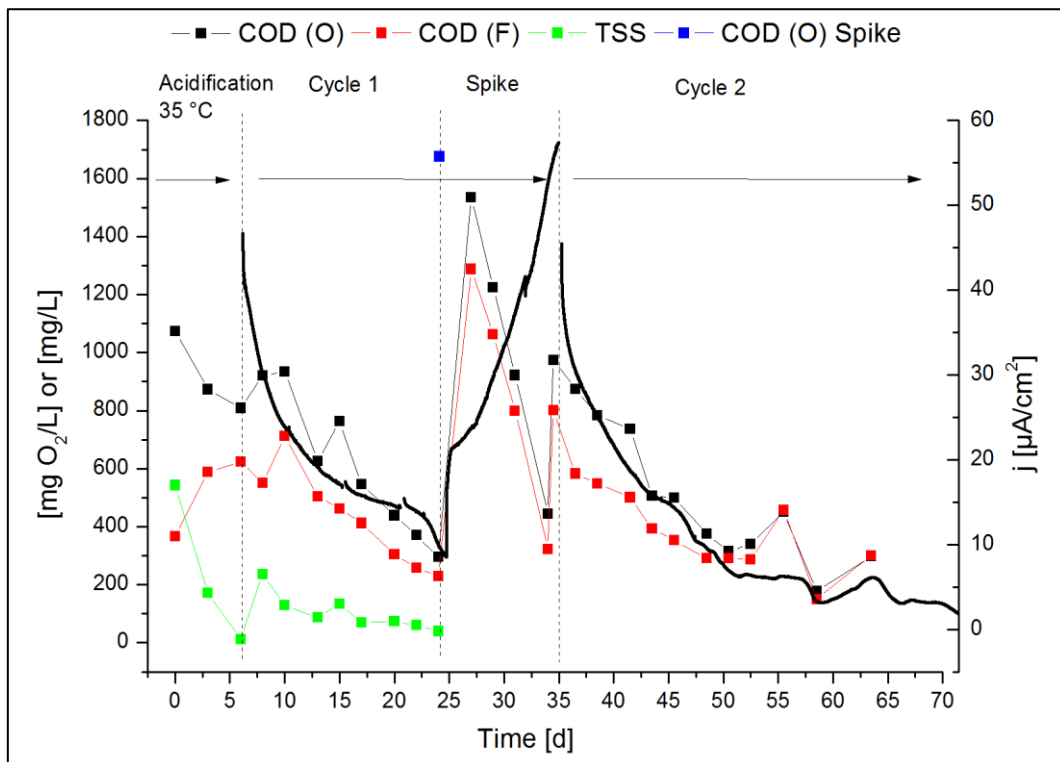


Figure 21: Development of the chemical oxygen demand (COD) [mg O<sub>2</sub>/L] and total suspended solids (TSS) [mg/L] are shown parallel to the development of the current density (*j*) over a period of 70 days. O: Original sample, F: filtered sample.

The impact of the spiking the medium with acetate and ammonium had an obvious and immediate impact. COD (O) increased as did the current density. The current density increased sharply as the COD (O) and (F) values decreased sharply. COD (O) was reduced by 72.9 mg O<sub>2</sub>/L\*d and COD (F) was reduced by 66.9 mg O<sub>2</sub>/L\*d over a period of 10 days minus the average COD reduction rates from cycle 1 and 2. It can be assumed that these rates are indicative of the acetate degradation because acetate equivalent measurements showed no acetate present in the medium before spiking. The results from the spiking demonstrate the necessity of growing a biofilm specifically for the purpose of utilising a specific type of wastewater. Although the results were 70% lower than the highest  $j_{\max}$  value measured in laboratory trials they were only 5  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  lower than the lowest  $j_{\max}$  measured in the laboratory trial which could be due to the volume difference of the two systems. This will be discussed further in chapter 5: Conclusions: Scaling-Up.

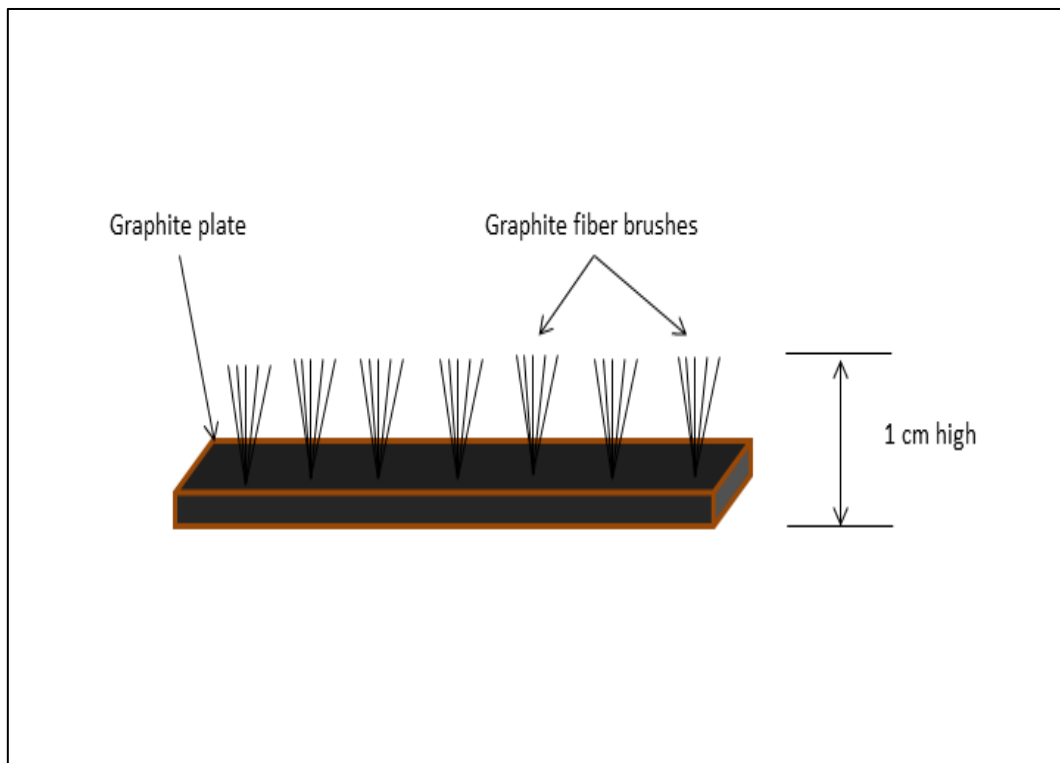
## 5. Conclusions: Scaling-up

The setup of the MFC is critical to operation performance and therefore the differences between the setup of the laboratory scale and the prototype scale MFCs must now be addressed. The results of the laboratory experiments and prototype trials have been described and discussed in the previous chapter. Their implications for the scaling-up of a MFC application will now be discussed in terms of the MFC's ability to lower chemical oxygen demand (COD), to eliminate ammonium and total Kjeldahl nitrogen (TKN) in comparison to reduction rate values from the activated sludge basin of the wastewater treatment plant "Steinhof" (KWS), Brunswick, Germany. Additionally the capacity for electricity production will be compared based on the results of laboratory experiments and prototype trials. The data used to derive the reduction rates for activated sludge basin and the hydraulic residence time are listed in Appendix 1 as provided by the "Abwasserverband Braunschweig".

The first performance indicator listed in *Table 9* is the surface to volume ratio (SVR) of the anode to reactor volume which is an important number for describing optimal operating setup. It has been shown that increasing the (specific) surface area leads to an improvement in MFC performance (Zhou, et al., 2011). As such one would assume that the prototype with its higher SVR, of  $0.19 \text{ cm}^2\text{cm}^{-3}$ , would show better performance than the laboratory scale MFCs with an SVR of  $0.07 \text{ cm}^2\text{cm}^{-3}$ .

This is the case for the COD (O) reduction rate, of  $36.2 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}\text{d}^{-1}$  as opposed to the reduction rate of  $20.2 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}\text{d}^{-1}$  achieved in the laboratory experiments. It has been proposed that increasing SVR to  $100 \text{ cm}^2\text{cm}^{-3}$  would allow an MFC to achieve COD reduction rate of  $\sim 7000 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}\text{d}^{-1}$  (Rozendal, et al., 2008). If this can be achieved it would surpass the COD reduction rate of a real wastewater treatment plant, e.g. KWS, with COD reduction rates of  $616 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}\text{d}^{-1}$  and,  $407 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}\text{d}^{-1}$  for original and filtered samples, respectively.

To increase SVR the anode should be changed from planar graphite plates to possible a “plate-brush”-like plate incorporating graphite fiber brushes, as shown in *Figure 22*, which seem to show the most promise for increasing MFC performance (Logan, *et al.*, 2007) without significantly increasing electrode size and therefore not increasing Ohmic resistance.



*Figure 22: Possible bioelectrode architecture to increase MFC performance.*

Nitrogen elimination rates for both  $\text{NH}_4^+$  and TKN are higher in the activated sludge basin of KWS in comparison at  $34/47 \text{ mg NH}_4\text{-N L}^{-1}\text{d}^{-1}$  to those of the prototype at  $2.0/1.9 \text{ mg NH}_4\text{-N L}^{-1}\text{d}^{-1}$ . However the reduction rate of the activated sludge tank is misleading because the majority of the eliminated nitrogen in the fluid wastewater is converted to organic N is retained in the sludge which exits the basin and has to be processed further by e.g. air stripping (Guštin, *et al.*, 2011). An additional advantage of the MFC approach to wastewater treatment is that  $\text{NH}_4^+$  was not converted to  $\text{NO}_2^-$  or  $\text{NO}_3^-$ , in either the laboratory experiment or prototype trials, and as such the need for additional treatment steps to remove these compounds is not necessary. The current prototype setup allows the removed ammonium to be concentrated in the cathode chamber to be removed without aid as gaseous

ammoniac and trapped in an acid trap for us a fertilizer. It can be assumed that the crossover of ammonium to the cathode chamber occurs more rapidly if  $H^+$  is depleted more rapidly and as such increasing general MFC performance should also increase ammonium and TKN reduction rates.

The reduction rates of COD (O), COD (F),  $NH_4^+$  and TKN of the prototype are approximately a factor 19 lower on average for all 4 parameters than those of the activated sludge basin. This suggests that increase the SVR by that factor to a value of  $3.6 \text{ cm}^2\text{cm}^{-3}$  would suffice to begin increasing performance the prototype MFC, assuming a linear increase of performance with increasing SVR and assuming stability of other influences.

*Table 9: Surface to volume (SVR) ratio, hydraulic residence time (HRT) and chemical oxygen ( $\Delta\text{COD}$ ) and, nitrogen ( $NH_4^+$ , total Kjeldahl nitrogen: TKN) ( $\Delta\text{N}$ ) reduction rates from laboratory scale, prototype scale and activated sludge basin of the wastewater treatment plant "Steinhof" (KWS). Average maximum current density ( $\phi_{j\text{max}}$ ) and average Coulombic efficiency ( $\phi_{\text{CE}}$ ) are listed for prototype trials and laboratory experiments using acetate/EAPT. EAPT: Effluent after pre-treatment, (O): original sample, (F): 0.45  $\mu\text{m}$  filtered sample, N/A: not available.*

|  | SVR                            | $\phi_{\text{HRT}}$ | COD (O)   | COD (F) | $NH_4^+$  | TKN | $\phi_{j\text{max}}$        | $\phi_{\text{CE}}$ |
|--|--------------------------------|---------------------|---|---------|---|-----|-----------------------------|--------------------|
|  | $[\text{cm}^2 \text{cm}^{-3}]$ | [d]                 | $\phi_{\Delta\text{COD}} [\text{mg O}_2/\text{L}\cdot\text{d}]$ |         | $\phi_{\Delta\text{N}} \text{mg} [NH_4\text{-N}/\text{L}\cdot\text{d}]$ |     | $[\mu\text{A}/\text{cm}^2]$ | [%]                |
| <b>Laboratory</b>                                      | 0.07                           | N/A                 | 20.2  | N/A     | N/A   | N/A | 525/80                      | 84/67              |
| <b>Prototype</b>                                       | 0.19                           | N/A                 | 36.2  | 23.7    | 2.0   | 1.9 | 83/46                       | 31/*               |
| <b>KWS</b>   | N/A                            | 1,13                | 616   | 407     | 34  | 47  | N/A                         | N/A                |
| <b>Reduction rate factor Ratio<br/>KWS : Prototype</b> |                                |                     | 17  | 17      | 17  | 24  | --                          | --                 |

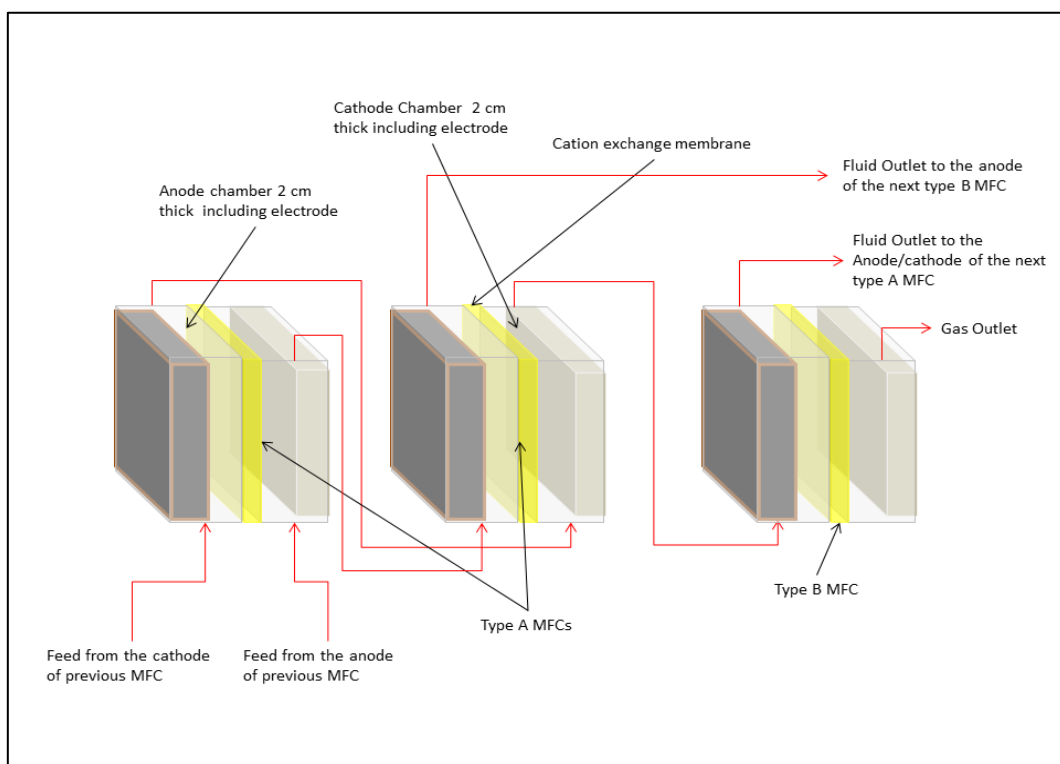
*\* $\eta$  for prototype trials using EAPT could not be calculated because  $Q_{\text{EleChem}} \gg Q_{\text{COD Ox}}$  see section 4.1 Influence of Residual and Accumulated Biomass for more details.*

The current prototype setup provided a total nitrogen reduction of 73 % which is just above the required 70 % reduction required by European law and a COD (O) reduction of 67 % which is 8 % lower than the standard set by European law. Both should be easily increased with an improved MFC design.

The experiments performed at laboratory scale showed better average maximum current density ( $\emptyset j_{\max}$ ) using acetate,  $525 \mu\text{Acm}^{-2}$  vs.  $83 \mu\text{Acm}^{-2}$ , or EAPT,  $80 \mu\text{Acm}^{-2}$  vs.  $46 \mu\text{Acm}^{-2}$ , and higher average Coulombic efficiency ( $\emptyset\text{CE}$ ) using acetate, 84 % vs. 31 %, than the corresponding trial runs at prototype scale as shown in *Table 9*. This could be due to the volume difference between the two systems with  $\sim 70$  % of the medium being unavailable to the biofilm in the prototype at any given time i.e. 30 L were in the anode chamber and 70 L were being cycled through the storage tank, tubes. In the course of the laboratory experiments the total volume of 200 mL was in the same chamber as the anode. Therefore the replenishment of substrate to the biofilm on the anode was accomplished faster in the laboratory experiments than in the prototype trials thus allowing higher current densities to be produced.

Another limiting factor of electrical current production was the shift in pH values in the cathode chamber from pH 7 to 12 using synthetic wastewater and from pH 7 to 10.4 using EAPT because of using a CEM in the prototype (Harnisch, et al., 2009) and not in the laboratory experiments. This has a negative impact on the current density which is to be expected (Rozendal, et al., 2006). Also the shift of the anode pH in prototype experiments to values lower than 7 may also inhibit the electroactive bacteria (Biffinger, et al., 2008). Using an air cathode would also be impractical because also here pH splitting has been shown to produce cathode pH values of up to 13 (Rozendal, et al., 2007). Therefore in order to improve MFC performance pH splitting between anode and cathode should be avoided or prevented by using anolyte and catholyte crossover from cell to cell (Freguia, et al., 2008). This would also eliminate the problem of phosphate diffusion from the buffer solution in the cathode chamber thereby preventing an increase in limiting factor of microbial growth after exiting the treatment step.

Taking the above mentioned necessities of increasing MFC performance in terms of both treatment efficiency and electricity production without losing the ability to generate useful by-products such as ammonium rich fertilizer I propose the use of the setup shown in *Figure 23*. Instead of using a single type of MFC a combination of two anode-to-cathode linked MFCs type A MFC, geared for optimal COD reduction and electricity production. After the first two MFCs the wastewater is put through a type B MFC which has a set catholyte which is not exchanged and is used to accumulate ammonium which is then released as gaseous ammoniac. The type B MFC would have lower current output and COD reduction rate but would ensure that toxic ammonium is also treated. As suggested previously the bioanodes, biocathodes in the type A MFCs and the in the type B MFCs could use the electrode architecture shown in *Figure 22* which would not allow for an ideal SVR of  $100 \text{ cm}^2\text{cm}^{-3}$  (Rozendal, *et al.*, 2008) because of the additional 1 cm thickness of each half cell instead possible a maximum of  $50 \text{ cm}^2\text{cm}^{-3}$  could still be realized which would be more than enough to achieve the required treatment rates as explained above a minimum of SVR  $3.6 \text{ cm}^2\text{cm}^{-3}$  would suffice.



*Figure 23: Possible MFC stack setup for optimal treatment efficiency and electricity production.*



## 6. References

- B. Logan, et al. 2007.** Graphite Fiber Brush Anodes for Increased Power Production in Air-Cathode Microbial Fuel Cells. *Environmental Science and Technology*. 2007, 41, S. 3341-3346.
- Balch, W. E., et al. 1979.** Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiological Reviews*. 1979, Bd. 43, 2, S. 260-296.
- Biffinger, J. C. & Ringeisen, B. R. 2008.** Engineering microbial fuels cells. *Recent Patents on Biotechnology*. 2008, Bd. 2, 3, S. 150-155.
- Biffinger, J.C, et al. 2008.** The influence of acidity on microbial fuel cells containing *Shewanella oneidensis*. *Biosensors & Bioelectronics*. 2008, 24, S. 906-911.
- British Petroleum. 2005.** Statistical Review of World Energy. 2005.
- Costerton, J. W., et al. 1987.** BACTERIAL BIOFILMS IN NATURE AND DISEASE;. *Ann. Rev. Microbiol.* 1987, 41, S. 435-464.
- Desloover, Joachim, et al. 2012.** Electrochemical Resource Recovery from Digestate to Prevent Ammonia Toxicity during Anaerobic Digestion. *Environmental Science & Technology*. 2012, Bd. 46, 21, S. 12209-12216.
- Flemming, H.-C & Wingender, J. 2010.** The biofilm Matrix. *Nature Reviews Microbiology*. 2010.
- Foley, J. M., et al. 2010 (a).** Life cycle assessment of high-rate anaerobic treatment, microbial fuel cells, and microbial electrolysis cells. *Environmental Science and Technology*. 2010 (a), Bd. 44, 9, S. 3629-3637.
- Foley, Jeffrey, et al. 2010 (b).** Comprehensive life cycle inventories of alternative wastewater treatment systems. *Water Research*. 2010 (b), Bd. 44, 5, S. 1654-1666.
- Freguia, Stefano, et al. 2008.** Sequential Anode-cathode Configuration Improves Cathodic Oxygen Reduction and Effluent Quality of Microbial Fuel Cells. *Water Research*. 2008, 42 (6-7), S. 1387-1396.
- Guštin, Simon & Marinšek-Logar, Romana. 2011.** Effect of pH, temperature and air flow rate on the continuous ammonia stripping of the anaerobic digestion effluent. *Process Safety and Environmental Protection*. 2011, Bd. 89, 1, S. 61-66.
- H. Liu, S. A. Cheng & B. E. Logan. 2005.** Power Generation in Fed-Batch Microbial Fuel Cells as a Function of Ionic Strength, Temperature, and Reactor Configuration. *Environmental Science and Technology*. 2005, 39, S. 5488-5493.
- Harnisch, Falk & Schroder, Uwe. 2010.** From MFC to MXC. *Chemical Society Reviews*. 2010, Bd. 39, 11, S. 4433-4448.
- Harnisch, Falk & Schroder, Uwe. 2009.** Selectivity versus Mobility: Separation of Anode and Cathode in Microbial Bioelectrochemical Systems. *ChemSusChem*. 2009, 2, S. 921-926.

- Harnisch, Falk, Schröder, Uwe & Scholz, Fritz. 2008.** The Suitability of Monopolar and Bipolar Ion Exchange Membranes as Separators for Biological Fuel Cells. *Environmental Science & Technology*. 2008, Bd. 42, 5, S. 1740-1746.
- Heidrich, E. S., Curtis, T. P. & Dolfing, J. 2011.** Determination of the Internal Chemical Energy of Wastewater. *Environmental Science & Technology*. 2011, Bd. 45, 2, S. 827-832.
- Ieropoulos, Ioannis A., Greenman, John & Melhuish, Chris. 2012.** Miniature microbial fuel cells and stacks for urine utilisation. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2012.
- Kim, J. R., Min, B. & Logan, B. E. 2005.** Evaluation of procedures to acclimate a microbial fuel cell for electricity production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005, Bd. 68, 1, S. 23-30.
- Korneel Rabaey, et al. 2010.** Bioelectrochemical systems: From extracellular electron transfer to biotechnological application. *IWA Publishing; London, U.K.; New York, U.S.A.* 2010, S. Chapter 5.
- Kuntke, P., et al. 2012.** Ammonium recovery and energy production from urine by a microbial fuel cell. *Water Research*. 2012, Bd. 46, 8, S. 2627-2636.
- Liu, Lihong, et al. 2011.** Occurrence of power overshoot for two-chambered MFC at nearly steady-state operation. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2011, Bd. 36, 21, S. 13896-13899.
- Logan, B. E., et al. 2006.** Microbial fuel cells. *Environmental Science and Technology*. 2006, Bd. 40, 17, S. 5181-5192.
- Minghua Zhou, et al. 2011.** An overview of electrode materials in microbial fuel cells. *Journal of Power Sources* 4427–4435. 2011, 196, S. 4427-4435.
- Pant, Deepak, et al. 2011.** An introduction to the life cycle assessment (LCA) of bioelectrochemical systems (BES) for sustainable energy and product generation: Relevance and key aspects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2011, Bd. 15, 2, S. 1305-1313.
- Pant, Deepak, et al. 2011.** Bioelectrochemical systems (BES) for sustainable energy production and product recovery from organic wastes and industrial wastewaters. *RSC Advances*. 2011, Bd. 2, 4, S. 1248-1263.
- Patil, S. A., et al. 2010.** Electroactive mixed culture biofilms in microbial bioelectrochemical systems: The role of temperature for biofilm formation and performance. *Biosensors & Bioelectronics*. 2010, Bd. 26, S. 803-808.
- Rozendal, R. A., et al. 2008.** Towards practical implementation of bioelectrochemical wastewater treatment. *Trends Biotechnol.* 2008, 26(8), S. 450-459.
- Rozendal, R. A., et al. 2007.** Performance of single chamber biocatalyzed electrolysis with different types of ion exchange membranes. *Water Research*. 2007, Bd. 41, 9, S. 1984-1994.
- Rozendal, R. A., et al. 2006.** Effects of membrane cation transport on pH and microbial fuel cell performance. *Environmental science & technology*. 2006, Bd. 40, 17, S. 5206-5211.

**S. A. Patil, F. Harnisch & U. Schröder. 2010.** Toxicity response of electroactive microbial biofilms - a decisive feature for potential biosensor and power source applications. *ChemPhysChem*. 2010, Bd. 11, S. 2834-2837.

**Schröder, Uwe. 2007.** Anodic electron transfer mechanisms in microbial fuel cells and their energy efficiency. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2007, Bd. 9, 21, S. 2619.

**United Nations. 2011.** World Population Prospects: The 2010 Revision. 2011.

**Uwe Schröder. 2006.** Biologische Brennstoffzellen - Strom aus mikrobiellen Kraftwerken? <http://www.aktuelle-wochenschau.de/2006/woche45b/woche45b.html>. 2006, Woche 45.

**Wingender, J., Neu, T. R. & Flemming, H.-C. 1999.** What are bacterial extracellular polymeric substances? In: Wingender, J., Neu, T. R., Flemming, H.-C. (eds.) Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure, and function. *Springer, Heidelberg, Berlin*. 1999, S. 1-18.

**Wong-Chong & George M. 1983.** Activated sludge wastewater treating process. *U.S. Patent 4537682*. 1983.

**Yang, Y., Sun, G. & Xu, M. 2010.** Microbial fuel cells come of age. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2010, Bd. 86, 5, S. 625-632.

**Appendix 1: Wastewater treatment data for the wastewater treatment plant „Steinhof“ courtesy of the „Abwasserverband Braunschweig“**

**Belegung: 51000 m<sup>3</sup>**

| Ablauf Vorklärung |                          |                |        |        |        |
|-------------------|--------------------------|----------------|--------|--------|--------|
| Datum             | Zulauf m <sup>3</sup> /d | R <sub>T</sub> | BSB, h | BSB, f | CSB, h |
| 07.08.2012        | 37100                    | 1,37           | 270    | 170    | 658    |
| 14.08.2012        | 41200                    | 1,24           | 350    | 290    | 675    |
| 21.08.2012        | 40100                    | 1,27           | 430    | 220    | 1097   |
| 28.08.2012        | 36900                    | 1,38           | 320    | 300    | 645    |
| 04.09.2012        | 48000                    | 1,06           | 330    | 280    | 649    |
| 11.09.2012        | 70000                    | 0,73           | 320    | 180    | 440    |
| 18.09.2012        | 48500                    | 1,05           | 310    | 210    | 754    |
| 25.09.2012        | 53000                    | 0,96           | 410    | 340    | 860    |

| Ablauf Vorklärung |       |           |       |     |      |
|-------------------|-------|-----------|-------|-----|------|
| Datum             | CSB,f | org.geb.N | NH4-N | TNb | Pges |
| 07.08.2012        | 451   | 14        | 43    | 57  | 9    |
| 14.08.2012        | 469   | 13        | 47    | 60  | 10,2 |
| 21.08.2012        | 452   | 41        | 39    | 80  | 18,3 |
| 28.08.2012        | 515   | 18        | 46    | 64  | 8,9  |
| 04.09.2012        | 544   | 15        | 48    | 63  | 8,8  |
| 11.09.2012        | 269   | 8         | 28    | 36  | 7,6  |

|            |     |    |    |    |      |
|------------|-----|----|----|----|------|
| 18.09.2012 | 502 | 20 | 46 | 66 | 11,1 |
| 25.09.2012 | 672 | 23 | 46 | 68 | 10,8 |

| Datum      | Ablauf Vorklärung |     | Ablauf Belebungsbecken/Klärwerk |        |      |
|------------|-------------------|-----|---------------------------------|--------|------|
|            | PO4-P             | pH  | CSB,h                           | CSB, f | TOC  |
| 07.08.2012 | 5,93              | 6,6 | 31                              | 30     | 10,5 |
| 14.08.2012 | 6,51              | 6,8 | 36                              | 35     | 11,1 |
| 21.08.2012 | 9,16              | 7,4 | 33                              | 32     | 13,1 |
| 28.08.2012 | 6,71              | 7,6 | 33                              | 32     | 11,6 |
| 04.09.2012 | 7,11              | 8   | 33                              | 33     | 11,6 |
| 11.09.2012 | 4,4               | 7,5 | 33                              | 29     | 12,5 |
| 18.09.2012 | 7,51              | 7,4 | 35                              | 33     | 12,3 |
| 25.09.2012 | 7,77              | 7,2 | 39                              | 36     | 14,1 |

| Datum      | Ablauf Belebungsbecken/Klärwerk |       |       |       |      |
|------------|---------------------------------|-------|-------|-------|------|
|            | org.geb.N                       | NH4-N | NO2-N | NO3-N | TNb  |
| 07.08.2012 | 2,2                             | 5,9   | 0,3   | 1     | 8,1  |
| 14.08.2012 | 3                               | 7,1   | 0,3   | 1     | 10,1 |
| 21.08.2012 | 4,5                             | 5     | 0,3   | 2,8   | 9,5  |
| 28.08.2012 | 5,7                             | 2,7   | 0,543 | 4,05  | 8,4  |
| 04.09.2012 | 5,4                             | 3,7   | 0,6   | 3,1   | 9,1  |
| 11.09.2012 | 4,7                             | 4,2   | 0,43  | 5,24  | 8,9  |

|            |     |     |      |      |      |
|------------|-----|-----|------|------|------|
| 18.09.2012 | 6,5 | 2,2 | 0,43 | 3,73 | 8,7  |
| 25.09.2012 | 4,5 | 5,8 | 0,3  | 1,5  | 10,3 |

Ablauf Belebungsbecken/Klärwerk

| Datum      | Pges | PO4-P | pH  |
|------------|------|-------|-----|
| 07.08.2012 | 0,69 | 0,56  | 7,6 |
| 14.08.2012 | 0,62 | 0,48  | 7,8 |
| 21.08.2012 | 1,1  | 0,86  | 7,5 |
| 28.08.2012 | 0,32 | 0,184 | 7,4 |
| 04.09.2012 | 0,43 | 0,31  | 7,4 |
| 11.09.2012 | 1,2  | 1     | 7,3 |
| 18.09.2012 | 0,32 | 0,14  | 7,3 |
| 25.09.2012 | 0,67 | 0,49  | 7,7 |

## **Masterarbeit**

### **Elektrochemisch aktive Biofilme auf Basis mikrobieller Konsortien:**

### **Grundlagenuntersuchung zur Verwendung von Mono - und Mischsubstraten**

Vorgelegt von:

André Baudler (B.Sc.)

Matrikelnummer: 2931072

geb. am 17.02.1987 in Gifhorn

Referent: Prof. Dr. Uwe Schröder

Koreferent: Prof. Dr. Dieter Jahn

Betreuer: Dr. Falk Harnisch

Zeitraum: 26.03.2012 – 26.09.2012

Kontakt: a.baudler@tu-braunschweig.de

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

-----

Ort/Datum

-----

Unterschrift



# Inhalt

|  |    |
|--|----|
| 1. Einleitung und Motivation .....                             | 1  |
| 2. Theoretische Grundlagen.....                                | 4  |
| 2.1 Biochemische Grundlagen .....                              | 4  |
| 2.1.1 Mikroorganismen .....                                    | 4  |
| 2.1.2 Energiestoffwechsel der Mikroorganismen .....            | 7  |
| 2.1.2.1 Monosaccharide .....                                   | 8  |
| 2.1.2.2 Glycerin .....   | 9  |
| 2.1.2.3 Fettsäuren .....                                       | 9  |
| 2.1.2.3 Acetat und Citrat.....                                 | 10 |
| 2.1.2.5 Lactat.....  | 11 |
| 2.1.3 Bakterielle Biofilme .....                               | 12 |
| 2.1.4 Extrazelluläre Elektronentransfermechanismen.....        | 14 |
| 2.1.4.1 Direkter Elektronentransfer.....                       | 15 |
| 2.1.4.2 Mediator gestützter Elektronentransfer.....            | 17 |
| 2.1.5 Sequenzanalyse .....                                     | 18 |
| 2.1.5.1 DNA/RNA Isolation .....                                | 19 |
| 2.1.5.2 Polymerase-Kettenreaktion .....                        | 19 |
| 2.1.5.3 Gelelektrophorese .....                                | 20 |
| 2.1.5.4 Sequenzierungstechniken .....                          | 21 |
| 2.2 Elektrochemische Grundlagen .....                          | 22 |
| 2.2.1 Drei-Elektroden-Anordnung .....                          | 22 |
| 2.2.2 Chronoamperometrie.....                                  | 23 |
| 2.2.3 Zyklische Voltammetrie.....                              | 25 |
| 2.2.4 Zyklovoltammogramme von Biofilmen .....                  | 27 |
| 2.2.5 Mikrobielle Brennstoffzellen.....                        | 29 |
| 2.5 Aus der Literatur bekannte Substrate.....                  | 33 |
| 3. Material und Methoden.....                                  | 37 |
| 3.1 Verwendete Mikroorganismen und Medien .....                | 37 |
| 3.1.1 Verwendete Chemikalien und mikrobielle Mischkultur ..... | 37 |
| 3.1.2 Künstliches Abwasser .....                               | 37 |
| 3.2 Verwendete Materialien und Messgeräte .....                | 38 |
| 3.2.1 Elektrodenpräparation.....                               | 38 |

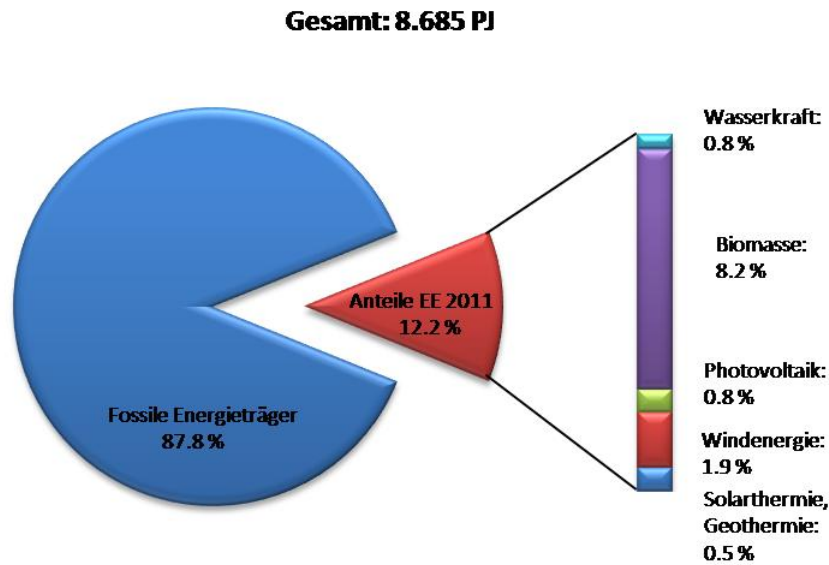
|  |    |
|--|----|
| 3.2.2 Aufbau der Messzellen .....  | 39 |
| 3.2.3 Messelektronik.....  | 40 |
| 3.2.4 HPLC-Analytik .....  | 40 |
| 3.3 Versuchsdurchführung .....   | 41 |
| 3.3.1 Screening verschiedener Substrate zur Erzeugung elektrochemisch aktiver Biofilme.....                                | 41 |
| 3.3.2 Biofilmbildung durch Verwendung ausgewählter Substrate .....   | 42 |
| 3.3.3 Untersuchungen an Mischsubstraten.....   | 44 |
| 3.3.4 Untersuchungen an realen Abwässern .....   | 44 |
| 3.3.5 Entwicklung eines Elektrodenhalters zur Untersuchung verschiedener Elektrodenmaterialien.....                        | 45 |
| 4. Ergebnisse und Auswertung .....   | 46 |
| 4.1 Screening verschiedener Substrate .....  | 46 |
| 4.2 Untersuchung von Monosubstraten und deren Einfluss auf die Biofilmbildung sowie deren elektrochemische Aktivität ..... | 54 |
| 4.2.1 Elektrochemische Untersuchungen .....  | 54 |
| 4.2.2 Biologische Untersuchungen .....   | 67 |
| 4.3 Untersuchungen an Mischsubstraten.....   | 76 |
| 4.4 Untersuchungen an realen Abwässern .....   | 80 |
| 4.5 Entwicklung eines Elektrodenhalters zur Untersuchung verschiedener Elektrodenmaterialien .....                         | 84 |
| 4.5.1 Graphit als Elektrodenmaterial .....   | 84 |
| 4.5.2 Edelstahl als Elektrodenmaterial.....  | 87 |
| 4.5.3 Untersuchung der Konnektivität.....  | 89 |
| 4.5.4 Galliumnitrid als Elektrodenmaterial .....   | 92 |
| 5. Zusammenfassung und Ausblick .....  | 95 |
| 5.1 Untersuchungen an Monosubstraten .....   | 95 |
| 5.2 Untersuchungen an Mischsubstraten und realen Abwässern .....   | 97 |
| 5.3 Entwicklung eines Elektrodenhalters zur Untersuchung verschiedener Elektrodenmaterialien .....                         | 98 |
| 6. Literaturverzeichnis .....  | 99 |

# 1. Einleitung und Motivation

Die wachsende Weltbevölkerung und der wachsende Lebensstandard stellen in vielen Bereichen des täglichen Lebens eine immer größer werdende Herausforderung dar. Alleine in den letzten einhundert Jahren stieg diese von ca. zwei auf sieben Milliarden Menschen an <sup>[2]</sup>. In der Folge stieg somit auch der weltweite Primärenergiebedarf <sup>[3]</sup>. Diese Entwicklung führt bereits zu diversen Problemen und wird zu weiteren Problemen führen. Zum Einen werden fossile Energieträger immer knapper bis die letzten Ressourcen schließlich verbraucht sind, zum Anderen steigt die mittlere Temperatur der Erde durch den anthropogenen Treibhauseffekt an. Die Folgen, die sich aus dem Treibhauseffekt ergeben könnten, wären katastrophal. Unter anderem würden sich in bereits trockenen Gebieten Dürren weiter ausbreiten, tiefliegende Areale könnten durch den Anstieg des Meeresspiegels von Überschwemmungen geplagt werden. Das Problem der Migration würde sich verschärfen und damit auf politischer und wirtschaftlicher Ebene Probleme forcieren <sup>[4]</sup>.

Durch immer teurer und knapper werdende Energiereserven sowie eine zunehmend nachhaltige Denkweise ist der Wille groß, die Verwendung erneuerbarer Energien (**EE**) weiter voranzutreiben und neue Wege zu erfassen. Heutzutage kommt nur ein vergleichbar geringer Teil von gerade einmal 12.2 % der benötigten Energie in Deutschland aus regenerativen Quellen wie z.B. der Windenergie, der Sonnenenergie oder der Wasserkraft (Abbildung 1.1) <sup>[5]</sup>.

## 1. Einleitung und Motivation



**Abbildung 1.1:** Anteil erneuerbarer Energien am Endenergieverbrauch in Deutschland im Jahr 2011 (modifiziert aus <sup>[5]</sup>).

Dies soll sich jedoch in den nächsten Jahrzehnten deutlich ändern und der prozentuale Anteil der regenerativen Energien am Energiemix stetig steigen. Am Beispiel Deutschland bedeutet das ein voraussichtliches Wachstum auf ca. 53 %. Hiermit wird das Ziel verfolgt, die CO<sub>2</sub>-Emissionen bis 2050 drastisch um ca. 80 % zu senken. Um dies möglich zu machen, soll vor allem der Verkehrssektor einigen Änderungen unterzogen werden. So soll etwa die Hälfte der Fahrzeuge auf den Straßen mit elektrischem Strom gespeist werden. Die andere Hälfte soll effizienter arbeiten, sowie Biokraftstoffe oder Wasserstoff nutzen <sup>[6]</sup>.

Ein wichtiger Schritt in diese Richtung könnte durch effizientere Verwertung von Biomasse erfolgen. Diese hat bereits einen hohen Anteil an den EE, der auch zukünftig ebenfalls steigen wird <sup>[6]</sup>. Biomasse kann dabei auf mehrere Arten genutzt werden: Zurzeit wird Biomasse zum größten Teil in Biogasanlagen mit angeschlossenen Blockheizkraftwerken zur Erzeugung von Strom und Wärme verwendet. Pro Kubikmeter Biogas wird hierbei eine durchschnittliche Leistung von 6 kWh erzielt. In Heizölequivalenten umgerechnet entspricht das ca. 0.6 L Heizöl <sup>[7]</sup>. Eine andere Art der Biomassenutzung ist die Verwendung in sog. mikrobiellen bioelektrochemischen Systemen (**BES**). Zu diesen Systemen gehören mikrobielle Brennstoffzellen (*Microbial Fuel Cells*, **MFC**) und mikrobielle Elektrolysezellen (*Microbial Electrolysis Cells*,

## 1. Einleitung und Motivation

**MEC**). In beiden Fällen wird die in Abwässern gespeicherte chemische Energie mit Hilfe von elektrochemisch aktiven (biofilmbildenden) Mikroorganismen zur Energiegewinnung genutzt. Ein weiterer positiver Effekt ist die simultane Reinigung des Abwassers. Der Unterschied zwischen den beiden Arten der BES liegt darin, dass die MEC unter externer Einspeisung von Strom (Überwindung der Überspannung) auf der Kathodenseite Wasserstoff reduziert und auch prinzipiell dazu genutzt werden kann, um gezielt organische Moleküle zu synthetisieren, während in der MFC ohne externe Stromzufuhr Sauerstoff zu Wasser reduziert wird <sup>[8]</sup>.

Die Entwicklung der MFCs wurde in den letzten Jahren stark vorangetrieben. Dennoch gibt es in diesem Bereich weiterhin viel Potential, um diese Systeme effizienter und kostengünstiger zu gestalten. Vor allem die Energie, die gewonnen werden kann ist bei weitem noch nicht ausreichend, um externe Verbraucher damit ökonomisch zu betreiben oder die Anlagen mit einer Kläranlage zu koppeln <sup>[8]</sup>. Daher ist es wichtig, gewisse Parameter wie die Coulombsche Effizienz (**CE**), die Stromdichte oder das Elektrodenmaterial zu verbessern und damit die Leistung zu optimieren.

**Ziel dieser Arbeit ist es, durch die Verwendung verschiedener Substrate zum einen die resultierende mikrobielle Zusammensetzung der anodischen Biofilme und zum anderen die daraus hervorgehenden elektrochemischen Leistungsparameter zu klassifizieren.**

Darunter fallen genauer:

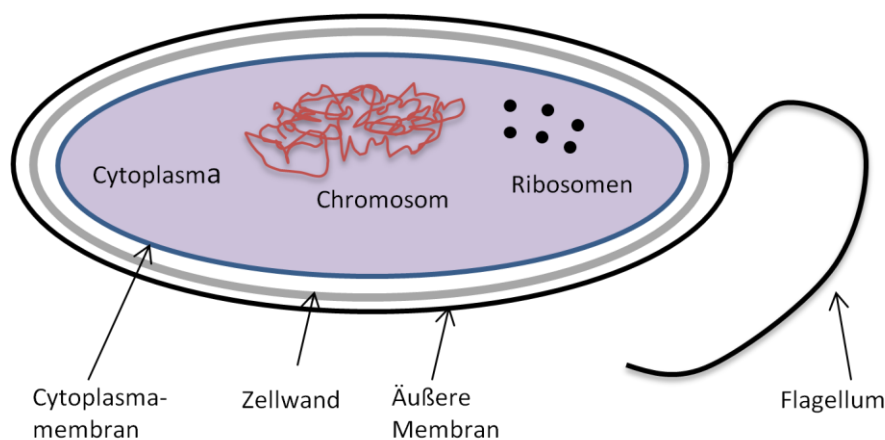
- die Ermittlung der molekularen Ökologie der Biofilme und die Abhängigkeit von ausgewählten Monosubstraten.
- die Bestimmung elektrochemischer Parameter wie Stromdichten ( $j$ ), Coulombsche Effizienzen ( $CEs$ ) und Formalpotentiale ( $E^f$ ).
- Grundlagenuntersuchungen zu Mischsubstraten und realen Abwässern und deren Einfluss auf die angesprochenen Parameter.

## 2. Theoretische Grundlagen

### 2.1 Biochemische Grundlagen

#### 2.1.1 Mikroorganismen

Obwohl Mikroorganismen die älteste bekannte Form von lebenden Zellen darstellen, wurden die ersten Bakterien erst im Jahr 1684 von *Antonie van Leeuwenhoek* entdeckt <sup>[9]</sup>. Dies lag daran, dass diese aufgrund ihrer Größe mit dem bloßen Auge nicht zu erkennen sind. Von Mikroorganismen ist die Rede, wenn die Größe eines Organismus zwischen 0.02  $\mu\text{m}$  und 1 mm liegt. Zu den Mikroorganismen gehören „tierische Einzeller, Hefen, kleine Hyphenpilze, Algen, Bakterien und Viren“ <sup>[9]</sup>. Der Aufbau einer bakteriellen Zelle ist beispielhaft in Abbildung 2.1 dargestellt.



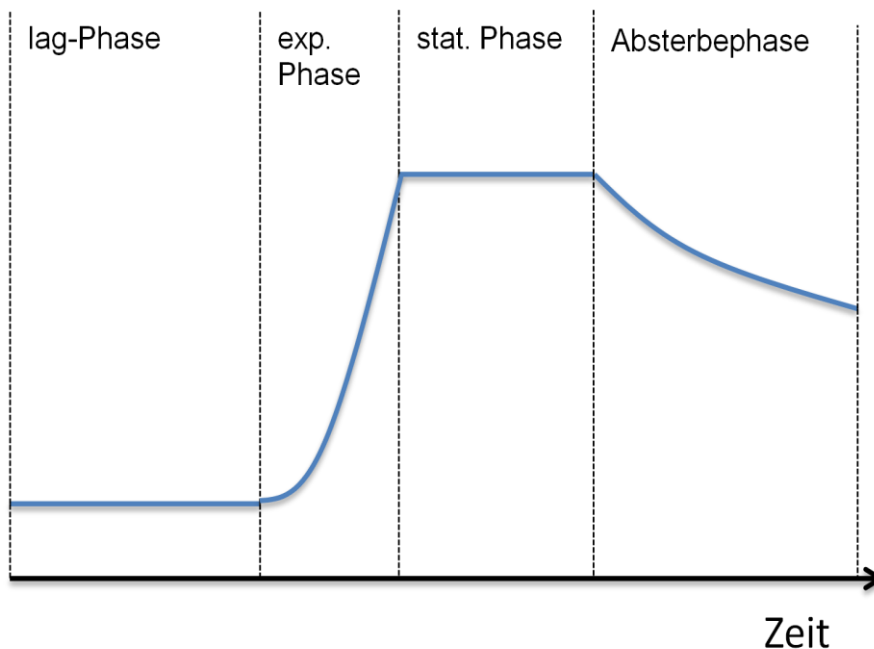
**Abbildung 2.1:** Schematischer Aufbau einer beispielhaften Bakterienzelle (modifiziert aus <sup>[10]</sup>).

Das zellinnere Cytoplasma, in dem sich vor allem die Desoxyribonukleinsäure (**DNA**), Plasmide, Ribosomen, Speicherstoffe und Lipidtropfen befinden, wird durch die Cytoplasmamembran abgegrenzt. Die DNA ist nicht durch einen Zellkern geschützt, sondern liegt frei im Cytoplasma. Weiterhin besitzen Bakterien eine äußere Zellwand, die der Zelle Stabilität verleiht und eine Permeabilitätsbarriere bildet. Außen an der Zelle können sich Pili, Filamente und Flagellen befinden, die es den Mikroorganis-

## 2. Theoretische Grundlagen

men erlauben untereinander Erbinformationen auszutauschen, sich an Oberflächen festzusetzen oder sich fortzubewegen <sup>[9]</sup>. Besonders interessant sind Mikroorganismen aufgrund ihrer Anpassungsfähigkeit. Bakterien zum Beispiel können unter den für den Menschen unwirklichsten Umständen (hoher Druck, hohe Temperaturen) überleben. Durch ihr großes Oberflächen/Volumen-Verhältnis sind sie wahre Stoffwechselmeister und können sich dadurch schnell auf äußere Begebenheiten einstellen und sich rasch vermehren. Das Bakterium *Escherichia coli* benötigt für die Zellteilung unter optimalen Bedingungen gerade einmal 20 Minuten. Im Gegensatz zum Menschen können einige Mikroorganismen sowohl aerob, als auch anaerob überleben, das bedeutet sie sind nicht an den Sauerstoff als zentralen Elektronenakzeptor gebunden, sondern sind auch in der Lage z.B. Nitrat zu Nitrit zu reduzieren <sup>[9]</sup>.

Die Vermehrung von Mikroorganismen findet über Zellteilung statt. Dabei entstehen aus einer Zelle zwei gleiche Tochterzellen. Das Wachstum einer Population lässt sich in vier unterschiedliche Bereiche einteilen: lag-Phase, exponentielle Phase, stationäre Phase und Absterbephase (Abb. 2.2).



**Abbildung 2.2:** Phasen des bakteriellen Wachstums (modifiziert aus <sup>[9]</sup>).

## 2. Theoretische Grundlagen

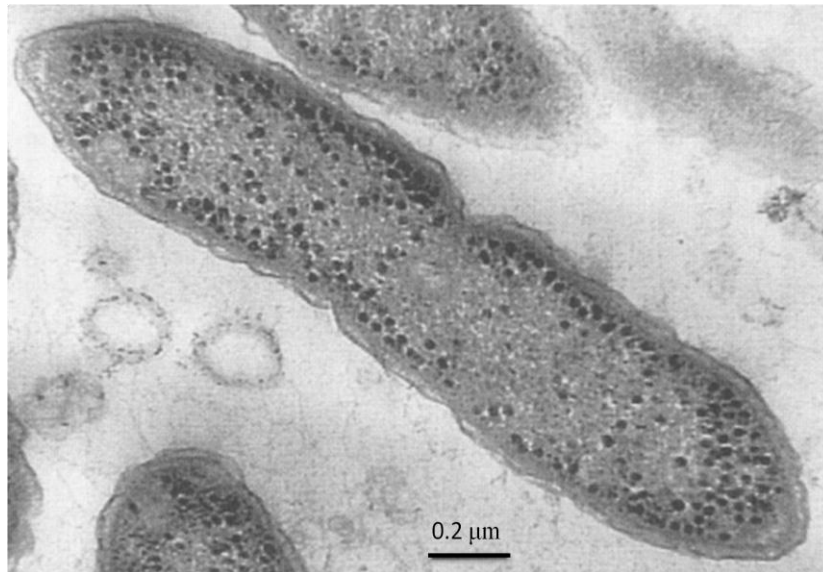
Wird davon ausgegangen, dass ein flüssiges Medium bestimmter Substratkonzentration mit Mikroorganismen angeimpft wird, so stellt sich zunächst die lag-Phase ein. In dieser benötigen die Mikroorganismen zuerst eine gewisse Zeit, um sich an die Umgebungseinflüsse zu gewöhnen und sich gegebenenfalls zu adaptieren, ohne dass die Zellzahl zunimmt. Die Dauer der lag-Phase kann je nach äußeren Einflüssen unterschiedlich lang sein. Während der exponentiellen Phase vermehren sich die Mikroorganismen, bis die Wachstumsrate ein Maximum erreicht. Durch eine Übergangsphase mit langsamer werdender Wachstumsrate wird anschließend die stationäre Phase eingeleitet, in der kein weiteres Zellwachstum mehr stattfindet. In dieser Phase werden Substratreserven aufgebraucht, die vorher angelegt wurden. Nach dem Verbrauch der Reserven folgt zuletzt die Absterbephase, in welcher die Zellzahl exponentiell abnimmt <sup>[9]</sup>.

Heutzutage werden Mikroorganismen vor allem in der Biotechnologie so eingesetzt, dass sie dem Menschen sehr nützlich sind. Die Einsatzmöglichkeiten sind dabei so vielseitig wie die Mikroorganismen selber. Angefangen von Abwasser- oder Bodenreinigung über die Synthese von speziellen Molekülen bis hin zur Stromerzeugung sind viele Einsatzmöglichkeiten bekannt <sup>[8,11]</sup>.

Letzteres spielt in mikrobiellen Brennstoffzellen eine wichtige Rolle, in denen Mikroorganismen ebenfalls eingesetzt werden. In vielen Publikationen über MFCs wird vor allem von Vertretern der Abteilung der *Proteobacteria* als elektrochemisch aktive Mikroorganismen berichtet. Besonders die Familie der *Geobacteraceae* ist dabei oft vertreten. Eine Spezies, die weitestgehend untersucht wurde, ist *Geobacter sulfurreducens*. *G. sulfurreducens* ist ein anaerob wachsendes, Gram-negatives Bakterium mit einer Länge von ca. 2-3 µm, einem Durchmesser von 0.5 µm und zeigt wenig Motilität. Diese Spezies wurde im Jahr 1994 von Caccavo *et al.* aus einem Bach in Norman, Oklahoma, isoliert (Abb. 2.3) <sup>[12]</sup>. Zuvor berichteten Lovley *et al.* im Jahr 1987 zum ersten Mal von der Entdeckung der Gattung *Geobacter* aus Sedimenten des Potomac River <sup>[13]</sup>. Vor der Entdeckung von *G. sulfurreducens* gab es keine bekannte Spezies, die gleichzeitig die Oxidation sowohl von Wasserstoff, als auch von Acetat mit der reduktiven Verwertung von Fe(III) koppeln konnte.



## 2. Theoretische Grundlagen



**Abbildung 2.3:** TEM Aufnahme von *Geobacter sulfurreducens* (modifiziert aus <sup>[12]</sup>).

Mittlerweile wird jedoch auch davon ausgegangen, dass *G. sulfurreducens* sehr wohl unter Sauerstoffatmosphäre überleben kann, gilt also nicht mehr als strikt anaerob. *Lin et al.* setzten *G. sulfurreducens* bis zu 24 Stunden einer Sauerstoffkonzentration von 10 % aus, was den Organismus in seinem Wachstum nicht hemmte <sup>[14]</sup>. Auch *Nevin et al.* konnten eine mikrobielle Brennstoffzelle erfolgreich mit *Geobacter sulfurreducens* unter aeroben Bedingungen testen <sup>[15]</sup>.

### 2.1.2 Energiestoffwechsel der Mikroorganismen

Der Stoffwechsel (Metabolismus) von Organismen dient zum einen der Bereitstellung von Energie (Katabolismus), zum anderen dem Aufbau von Zellmasse (Anabolismus). Von großer Bedeutung sind hier die Glykolyse und der Citratzyklus.

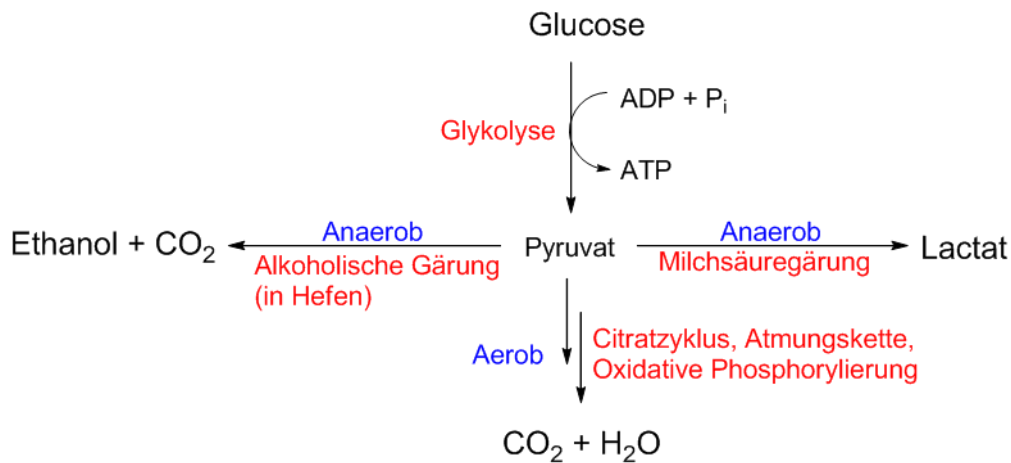
Der Energiestoffwechsel vieler Mikroorganismen beruht grundsätzlich auf der Fähigkeit chemische Bindungen zu brechen und Kohlenstoffgerüste zu oxidieren (Chemoorganoheterotrophie). Natürlich gibt es noch weitere Arten des Energiestoffwechsels, die sich nach Art der Energiequelle, des Elektronendonors und der Kohlenstoffquelle unterscheiden (viele Pflanzen sind bspw. photohydroautotrophe Organismen) <sup>[16]</sup>. Da in dieser Arbeit verschiedene Substrate untersucht werden (siehe Kapitel 3.3.1), wird der Abbau einiger Kohlenstoffe genauer erläutert und besonderes

## 2. Theoretische Grundlagen

Augenmerk auf den Stoffwechsel von *G. sulfurreducens* gelegt. Die vorgestellten Stoffwechselwege ergänzen sich dabei untereinander so, dass bestimmte Endprodukte eines Weges Ausgangsverbindungen für einen anderen Weg darstellen.

### 2.1.2.1 Monosaccharide

Der Abbau von Zuckern kann in mehreren Schritten sowohl aerob als auch anaerob ablaufen und soll am Beispiel von Glucose erläutert werden (Abb. 2.4).



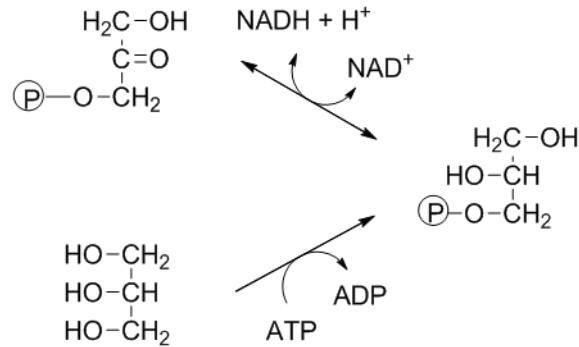
**Abbildung 2.4:** Mögliche aerobe und anaerobe Stoffwechselwege zum Zuckerabbau (modifiziert aus<sup>[17]</sup>).

In beiden Fällen wird die Glucose zuerst durch die Mechanismen der Glykolyse zum Pyruvat umgesetzt. Unter aeroben Bedingungen wird das Pyruvat nun über weitere Zwischenschritte vollständig bis hin zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O oxidiert. Der Verlauf unter anaeroben Bedingungen kann jedoch auf zwei Arten erfolgen. Zum einen kann dies die alkoholische Gärung sein, durch die Hefen das Pyruvat zu Ethanol und CO<sub>2</sub> umsetzen. Zum anderen läuft die Milchsäuregärung ab, durch die am Ende Lactat entsteht. Bereits das Pyruvat kann in den Citratzyklus eingeschleust werden (vgl. Abb. 2.7). Für den Energiestoffwechsel ist es von Interesse, dass beim anaeroben Abbau von einem Mol Glucose gerade einmal zwei Mol Adenosintriphosphat (**ATP**) gebildet werden, während der aerobe Abbau zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O ca. 30 Mol ATP liefert<sup>[17]</sup>.

## 2. Theoretische Grundlagen

### 2.1.2.2 Glycerin

Über den Stoffwechselweg der Glykolyse kann auch Glycerin über die Zwischenstufe Glycerin-3-phosphat als Dihydroxyacetonphosphat eingeschleust werden (Abb. 2.5).



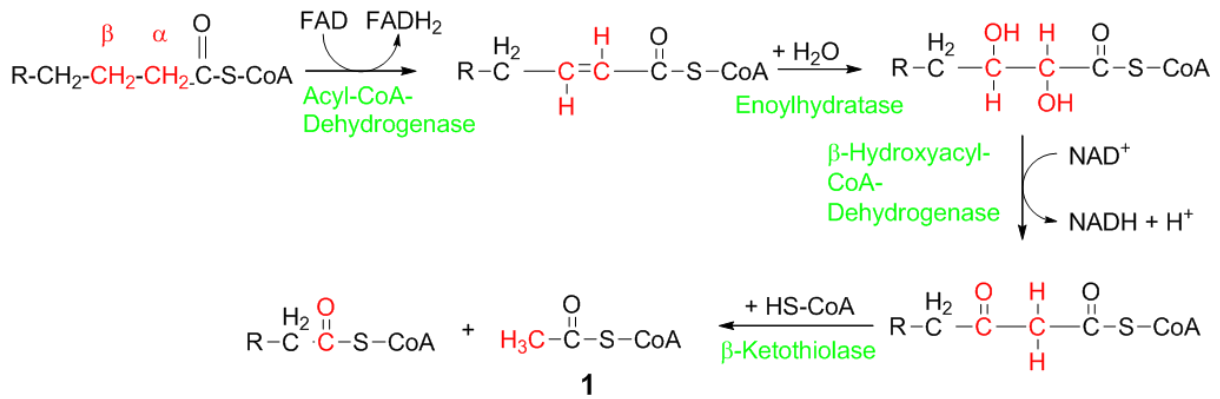
**Abbildung 2.5:** Abbau von Glycerin (modifiziert aus <sup>[17]</sup>).

Im Verlauf der Glykolyse wird das Dihydroxyaceton dann über mehrere Schritte bis hin zum Pyruvat oxidiert. Dieses kann dann ebenfalls dem Citratzyklus (Abb. 2.7) zugeführt werden <sup>[17]</sup>.

### 2.1.2.3 Fettsäuren

Fettsäuren werden durch die sogenannte  $\beta$ -Oxidation abgebaut. Dabei werden in mehreren Schritten die Bestandteile der Fettsäure nacheinander auf Coenzym A übertragen und somit aktiviert. Die aktivierte Form wird als Acyl-CoA bezeichnet. Der eigentliche Abbau kann in mehrere Phasen unterteilt werden und unterscheidet sich je nach Art der Fettsäure (Anzahl C-Atome, gesättigt/ungesättigt) geringfügig. Der Abbau einer geradzahigen Fettsäure ist in Abbildung 2.6 zu sehen.

## 2. Theoretische Grundlagen



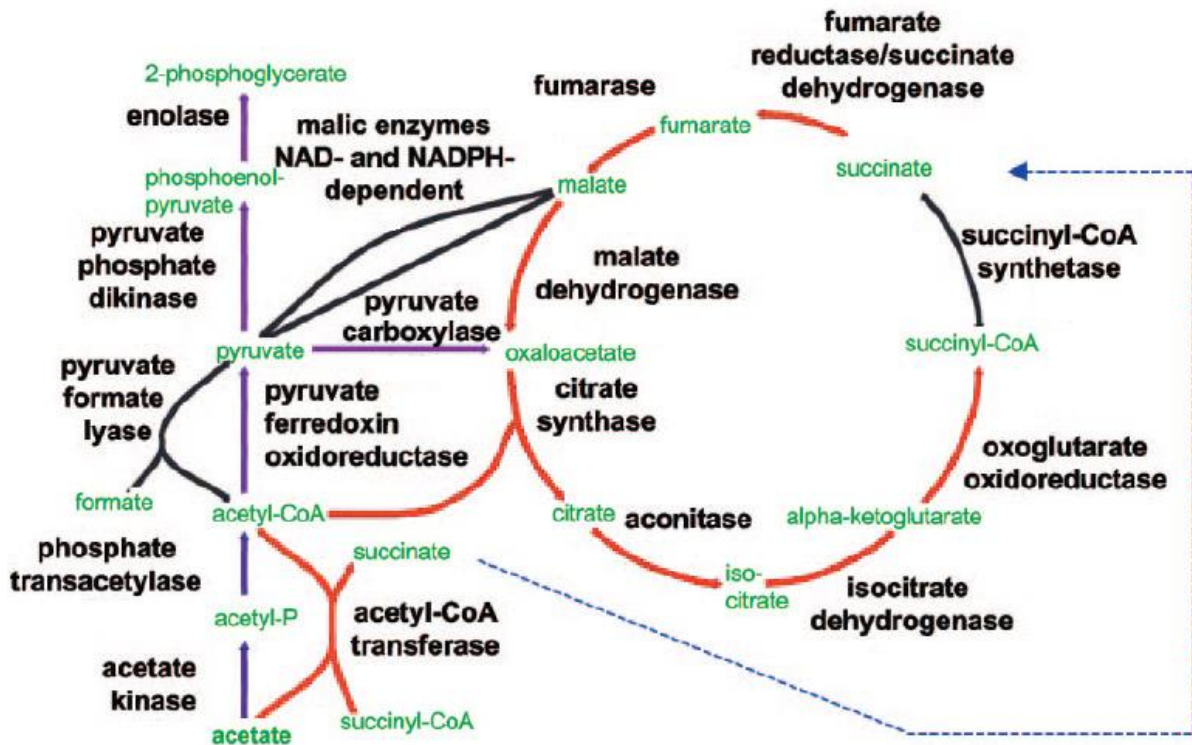
**Abbildung 2.6:**  $\beta$ -Oxidation einer geradzahligen Fettsäure (modifiziert aus <sup>[17]</sup>).

Im ersten Schritt wird das aktivierte Acyl-CoA mit Hilfe von Flavin-Adenin-Dinukleotid (**FAD**) zum Enoyl-CoA oxidiert, sodass eine Doppelbindung zwischen  $C_\alpha$  und  $C_\beta$  in das Molekül eingebaut wird. Danach wird Wasser addiert und Hydroxyacyl-CoA erhalten. Anschließend findet eine erneute Oxidation statt, diesmal jedoch mit Nicotinamidadenindinukleotid (**NAD<sup>+</sup>**) als Elektronenakzeptor. Es entsteht Ketoacyl-CoA. Zuletzt findet die Thiolyse statt, durch die Acetyl-CoA **1** und erneut Acyl-CoA gebildet werden. Das Acetyl-CoA steht nun für den Citratzyklus zur Verfügung, das Acyl-CoA wird wieder dem Kreislauf zugeführt, bis daraus letztendlich zwei Moleküle Acetyl-CoA entstehen und der Abbau vollständig ist <sup>[17]</sup>.

### 2.1.2.3 Acetat und Citrat

Wie am Anfang dieses Kapitels bereits erwähnt, werden viele Stoffwechselprodukte dem Citratzyklus bereitgestellt. Acetat wird von *G. sulfurreducens* über den Citratzyklus abgebaut. (Abb. 2.7).

## 2. Theoretische Grundlagen



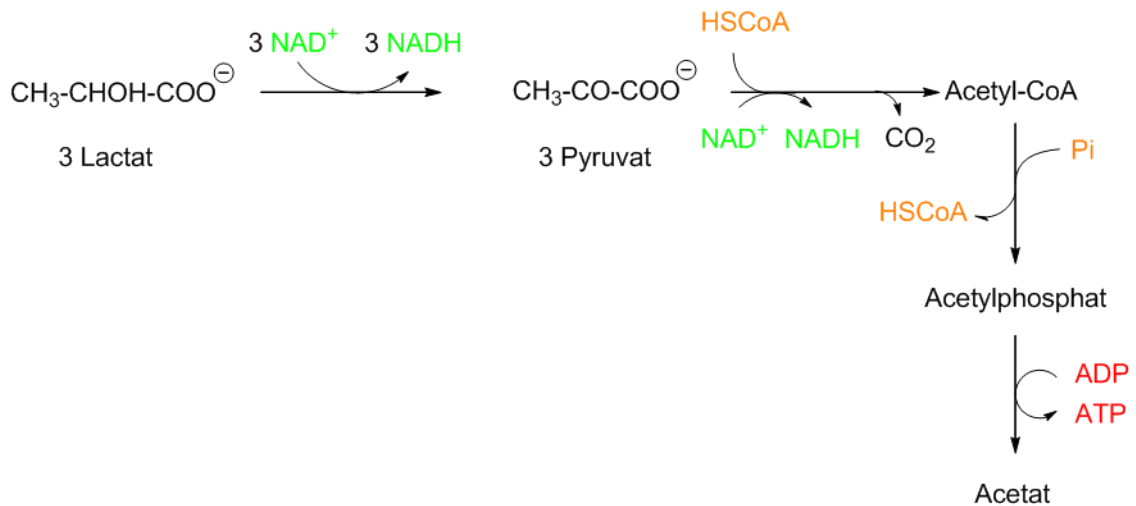
**Abbildung 2.7:** Die Stoffwechselwege von *G. sulfurreducens* (modifiziert aus <sup>[18]</sup>).

Die Stoffwechselreaktionen des Citratzyklus finden im Cytoplasma statt. Dabei wird Acetat in den Stoffwechsel eingeschleust, indem die Acetyl-CoA-Transferase unter Verbrauch von ATP Acetyl-CoA bildet. Die Acetyl-Gruppe wird während des Kreislaufs komplett zu  $\text{CO}_2$  oxidiert. Außerdem werden einige Intermediate bereitgestellt, die im Baustoffwechsel Verwendung finden. Um dies zu bewerkstelligen, finden eine Vielzahl an Enzymen im Citratzyklus Verwendung, welche jeweils nur eine einzige Reaktion katalysieren. Hierbei sind die meisten Schritte reversibel, jene Reaktionen, welche durch Citratsynthase, Isocitrat-Dehydrogenase und  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase eingeleitet werden, jedoch nicht <sup>[9]</sup>. Citrat wird direkt in den Citratzyklus eingeschleust.

### 2.1.2.5 Lactat

Lactat wird von den Mikroorganismen nicht so leicht verstoffwechselt wie Acetat. Hierfür gibt es den sogenannten Methylmalonyl-Coenzym A- Weg (Abb. 2.8) <sup>[9]</sup>.

## 2. Theoretische Grundlagen



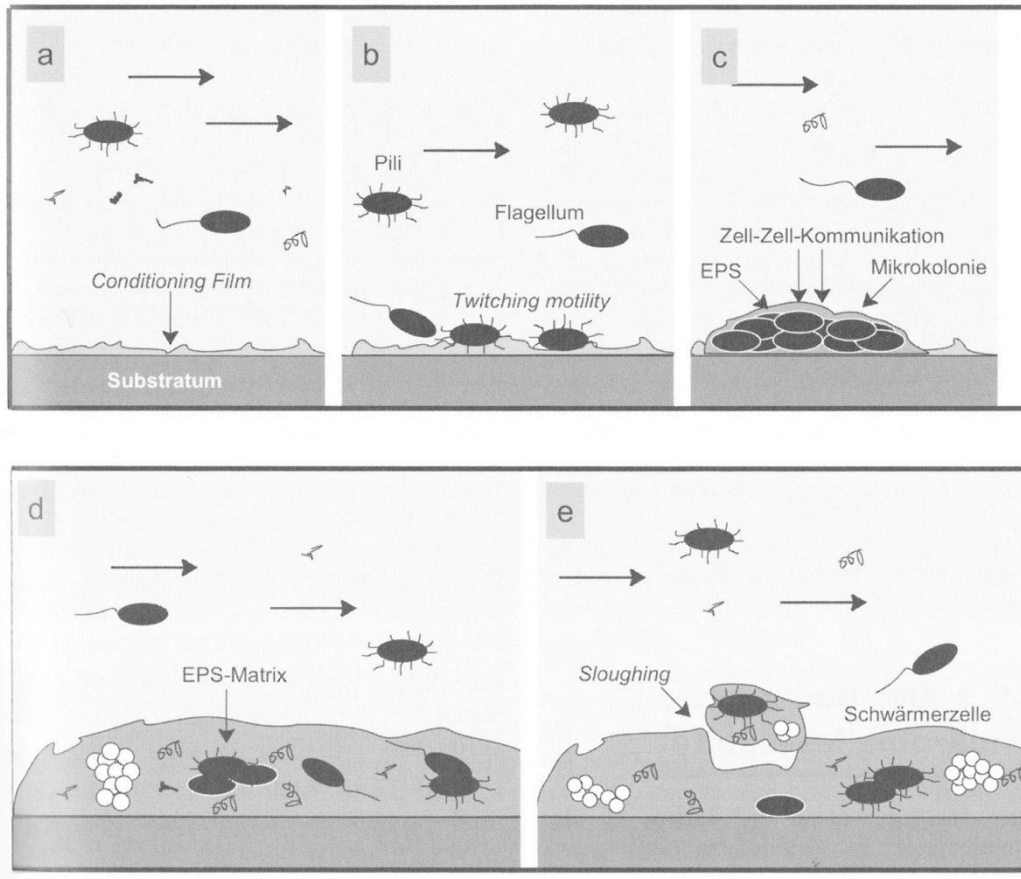
**Abbildung 2.8:** Ein Teil des Methylmalonyl-Coenzym A- Weges (modifiziert aus <sup>[9]</sup>).

Das über diesen Weg gebildete Acetat kann wieder im Citratzyklus genutzt werden. Allerdings ist für die Verwertung von Lactat zu Acetat ein entsprechend höherer Energiebetrag durch den Organismus aufzuwenden.

### 2.1.3 Bakterielle Biofilme

Ein Biofilm ist eine „Lebensgemeinschaft von Mikroorganismen einer oder verschiedener Arten auf Grenzflächen in wässrigen Systemen.“ Eine selbst synthetisierte „Matrix aus Exopolysacchariden (**EPS**) schützt die Zellen, unterschiedliche Arten ergänzen sich in ihren physiologischen Fähigkeiten“ <sup>[9]</sup>. Ihre Bildung lässt sich grob in drei unterschiedliche Phasen einteilen: die Induktions-, die Akkumulations- und die Existenzphase (Abb. 2.9).

## 2. Theoretische Grundlagen



**Abbildung 2.9:** Schematische Darstellung der Biofilm-Bildung (aus <sup>[19]</sup>).

In wässrigem Milieu können sich an vielen Oberflächen (Felsen, Steine, Rohre) organische Substanzen anlagern (Induktionsphase), die es den Mikroorganismen erleichtern, sich an der Oberfläche festzusetzen (Akkumulationsphase). Diese organischen Substanzen werden von den Mikroorganismen als Substrate für ihren Stoffwechsel genutzt. Durch das „Quorum Sensing“ - eine Art interzellulärer Kommunikationsweg zwischen einzelnen Mikroorganismen - sammeln sich immer mehr Mikroorganismen an und bilden eine sogenannte Mikrokolonie. Ausgehend von diesen Mikrokolonien vermehren sich die Mikroorganismen und bilden einen flachen Film auf der Grenzschicht, gleichzeitig entstehen sogar dreidimensionale Strukturen. Zuletzt stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Bildung und Abbau des Biofilms ein (Existenzphase) <sup>[19]</sup>. Ein Biofilm kann dabei aus einer einzigen Bakterienspezies, allerdings auch aus einer Mischkultur mehrerer Arten bestehen. Ein Großteil der Masse eines Biofilms (ca. 97 %) besteht aus Wasser <sup>[20]</sup>.

## 2. Theoretische Grundlagen

In der Natur sowie auch in der Technik kommen Biofilme weit verbreitet vor. Biofilme bieten den beheimateten Mikroorganismen viele Vorteile gegenüber freien (planktonischen) Zellen. Dies kommt zustande, da in einem Biofilm jeder beteiligte Organismus eine andere Aufgabe erfüllt. Änderungen der äußeren Begebenheiten, wie ein sich ändernder pH-Wert, wechselnde Temperaturen oder das Vorhandensein von Schadstoffen, können durch den Biofilm als Ganzes kompensiert werden <sup>[19]</sup>. Oft sind Biofilme allerdings auch unerwünscht und können ökonomische, wie auch gesundheitsschädliche Folgen haben. So können Biofilme z.B. in Rohren von technischen Anlagen den möglichen Durchfluss stark verringern. Biofilmbildende Bakterien im menschlichen Körper sind beispielsweise schlechter erreichbar für das Immunsystem oder therapeutische Anwendungen <sup>[19]</sup>. Ein allgemein bekanntes Beispiel für einen unerwünschten Biofilm liefert der weißlich-gelbe Zahnbelag. Dieser besteht u.a. aus *Streptococcus mutans* und ist für die Bildung von Karies verantwortlich <sup>[16]</sup>.

In bioelektrochemischen Systemen spielen Biofilme ebenfalls eine entscheidende Rolle. Toxizitätsuntersuchungen von *Patil et al.*, bei denen Biofilme verschiedenen bioziden Wirkstoffen wie beispielsweise Sulfamethoxazol oder Schwermetallen wie Kupfer ausgesetzt wurden, zeigten gute Widerstandsfähigkeiten. Planktonische Zellen, die den gleichen Bioziden ausgesetzt wurden, zeigten jedoch eine deutliche Beeinträchtigung in ihrer Leistung <sup>[21]</sup>.

### 2.1.4 Extrazelluläre Elektronentransfermechanismen

Während des Stoffwechsels der Mikroorganismen werden durch oxidative Vorgänge Reduktionsäquivalente (Protonen und Elektronen) frei. Mikroorganismen geben die so entstandenen Elektronen unter anderem über Prozesse in der Atmungskette auf Elektronenüberträger wie NADH, Ubichinon oder Coenzym Q ab, die die Elektronen ihrerseits wieder weiterleiten und aus der Zelle transportieren können <sup>[22]</sup>. Der Vorgang, Elektronen aus der lebenden Zelle hinaus zu schleusen, sodass die Reduktionen außerhalb der Zelle stattfinden können - also ein externer terminaler Elektronenakzeptor genutzt wird - heißt extrazellulärer Elektronentransfer (**EET**). Der umgekehrte Vorgang, d.h. die Nutzung eines unlöslichen Donors wird ebenfalls als EET bezeichnet <sup>[8]</sup>. Als externer Akzeptor kann in der Natur  $\text{Fe}^{3+}$ , aber auch eine leicht positiv polarisierte Elektrode mit geringem Eigenwiderstand dienen.



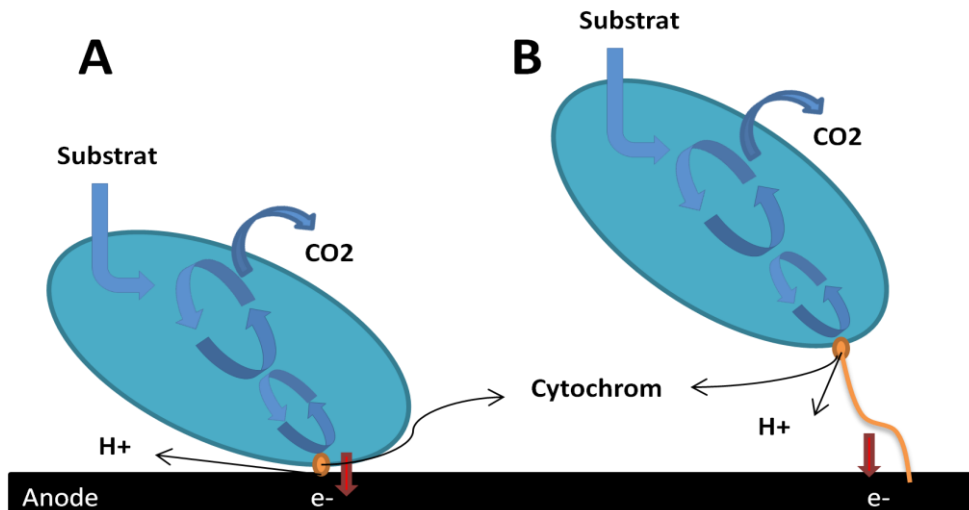
## 2. Theoretische Grundlagen

Um Elektronen an äußere Akzeptoren abzugeben, stehen verschiedene Mechanismen zur Verfügung. Dabei handelt es sich einerseits um den direkten Elektronentransfer (**DET**) und andererseits um den Mediator gestützten Elektronentransfer (**MET**), welche sich jeweils noch weiter differenzieren lassen <sup>[23]</sup>.

### 2.1.4.1 Direkter Elektronentransfer

Beim direkten Elektronentransfer muss ein direkter Kontakt der Mikroorganismen mit einer Strom leitenden Oberfläche vorhanden sein (Abb. 2.10). Dazu ist es möglich, dass die Mikroorganismen mit ihrer äußeren Membran am Elektronenakzeptor „andocken“ (Abb. 2.10 **A**) oder aber ein Kontakt durch ausgebildete, leitfähige Pili (Nanowires) hergestellt wird (Abb. 2.10 **B**). Ersteres würde bedeuten, dass nur angelegerte Zellen in Monolage dazu fähig wären, ihre Elektronen abzugeben, da Mikroorganismen in einer zweiten oder dritten Schicht nicht mehr in direktem Kontakt mit der Oberfläche des Akzeptors stehen. Weiterhin wäre dann die Besiedlungsdichte der limitierende Faktor bezüglich des maximal erzeugbaren Stromes. Zur Weitergabe der Elektronen über Teile der Atmungskette bis hinaus aus der Zelle befinden sich in der äußeren Membran Cytochrome, über welche die Elektronen dann z.B. an eine Elektrode abgegeben werden können <sup>[23]</sup>.

## 2. Theoretische Grundlagen



**Abbildung 2.10:** Beispielhafte Darstellung des DET über direkten Kontakt über die Zellmembran durch Cytochrome (A), sowie über Nanowires (B) (modifiziert aus <sup>[23]</sup>).

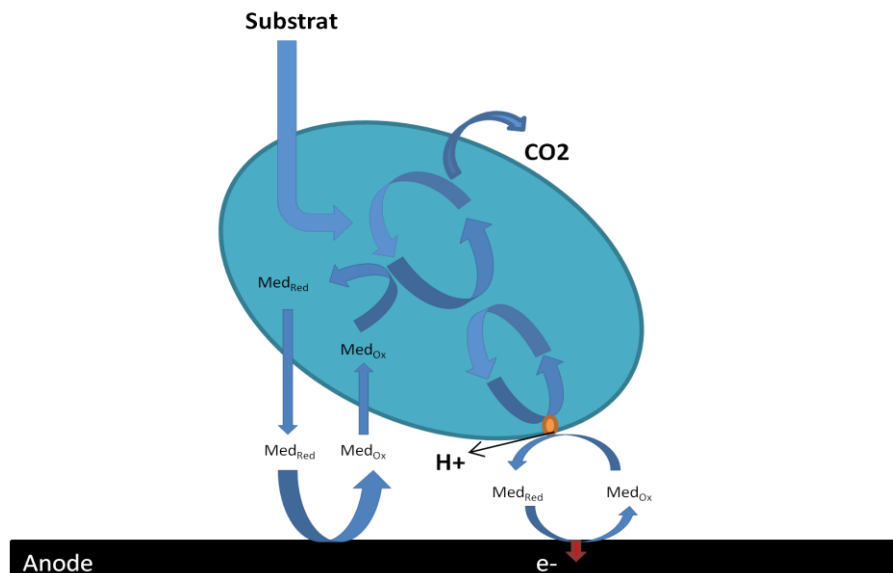
Bei der Theorie der Nanowires, welche an die Cytochrome der äußeren Membran gebunden sind, wird davon ausgegangen, dass einige Mikroorganismen elektrisch leitfähige Pili ausbilden, über die der Elektronentransfer stattfinden kann. Diese Theorie würde auch eine Weitergabe von Elektronen über eine Anordnung von Mikroorganismen in mehreren Lagen auf dem Akzeptor erlauben, da nun der Kontakt über weitere Distanzen gewährleistet wäre. Damit würde auch der Wert des maximal erzeugbaren Stroms steigen <sup>[23]</sup>. Die Nanowire-Theorie ist jedoch zurzeit noch sehr umstritten und erfordert weitere Forschungsbemühungen. *Lovley et al.* konnten Pili von *Geobacter* Spezies extrahieren und zeigen, dass diese eine gewisse Leitfähigkeit um  $6 \mu\text{S}/\text{cm}^2$  besitzen. Die Art und Weise des Ablösens der Pili von den Zellen, sowie deren Extraktion sind jedoch recht ungenau beschrieben. Des Weiteren konnte in den Experimenten gezeigt werden, dass ein Biofilm aus *G. sulfurreducens* einen nicht-leitenden Spalt, der um ein Vielfaches größer ist als eine lebende Zelle, durch leitende Pili überbrücken kann. Gegen diese Theorie spricht allerdings vor allem, dass die meisten organischen Substanzen, deren Gerüst auf Aminosäuren beruht, eher als Isolatoren und weniger als elektrische Leiter wirken <sup>[24]</sup>.

## 2. Theoretische Grundlagen

Wie aus Abbildung 2.10 ebenfalls hervorgeht, können Mikroorganismen Elektronen untereinander, aber auch zwischen verschiedenen Spezies austauschen. Dieses Phänomen ist insbesondere bei der Untersuchung von Biofilmen von Interesse, da hier oft verschiedenste Spezies zusammen interagieren <sup>[22]</sup>.

### 2.1.4.2 Mediator gestützter Elektronentransfer

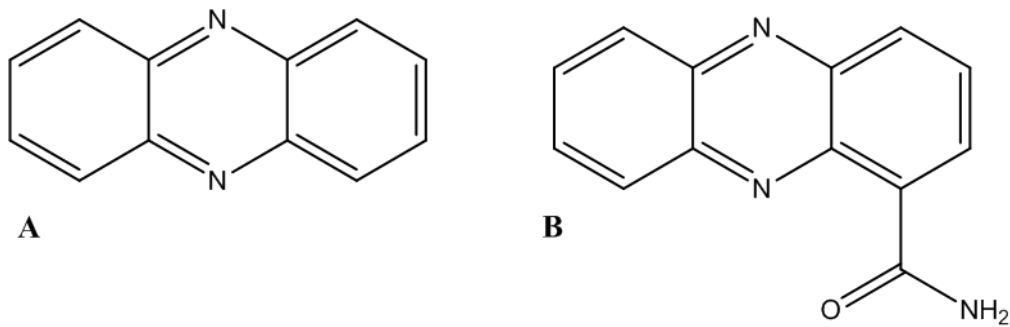
Der MET beruht nicht auf einem direkten Kontakt zwischen Mikroorganismus und Elektrode, sondern auf der Weitergabe von Elektronen zwischen redoxaktiven Molekülen, die als „Elektronenshuttle“ fungieren (Abb. 2.11).



**Abbildung 2.11:** Beispielhafte Darstellung des MET mittels sekundärer Metabolite (modifiziert aus <sup>[23]</sup>).

Dabei werden die, durch die Oxidation der Substrate entstandenen, Elektronen aus der Zelle geschleust und reduzieren extrazelluläre Substanzen (Mediatoren), die an der Anode wiederum reoxidiert werden. Der MET kann dabei generell auf künstlichen Mediatoren, primären oder sekundären Metaboliten beruhen (Abb. 2.12) <sup>[23]</sup>.

## 2. Theoretische Grundlagen



**Abbildung 2.12:** Künstlicher Mediator **A** und sekundärer Metabolit **B** (modifiziert aus <sup>[23]</sup>).

Bei den Mediatoren handelt es sich dabei um Verbindungen, die ausgedehnte  $\pi$ -Systeme besitzen und so einen stabilen Ladungstransport begünstigen. Der Einsatz von Mediatoren (vor allem der künstlichen) bringt jedoch einige Nachteile mit sich. Zum einen müssen diese dem System ständig zugefügt werden, um die Leistung aufrecht zu erhalten, und zum anderen sind viele Mediatoren giftig und daher nicht für die Verwendung in offenen Systemen geeignet <sup>[25]</sup>. Damit wird eine Nutzung im nachhaltigen Sinne in Frage gestellt. Allerdings konnte gezeigt werden, dass Mikroorganismen Mediatoren auch selber biosynthetisch herstellen können (primäre und sekundäre Metabolite), um diese als Elektronenshuttle zu nutzen. Dabei können Mediatoren, die von einem Organismus synthetisiert wurden, von anderen Organismen ebenfalls genutzt werden. Das bietet den Vorteil, dass keine künstlichen Mediatoren zugegeben werden müssen. Beispiele für Mediatoren sind Phenazin (Abb. 2.12 **A**) oder Phenazin-1-carboxamid (Abb. 2.12 **B**), aber auch Farbstoffe wie Methylviologen oder Neutral Rot <sup>[22,23]</sup>.

### 2.1.5 Sequenzanalyse <sup>[1] 1)</sup>

Da in dieser Arbeit die molekulare Ökologie der generierten Biofilme in Abhängigkeit des verwendeten Substrats untersucht werden soll, werden in diesem Kapitel die hierzu verwendeten Sequenzierungstechniken kurz vorgestellt.

## 2. Theoretische Grundlagen

### 2.1.5.1 DNA/RNA Isolation

Heutzutage gehört die Isolation der Desoxyribonukleinsäure (**DNA**) und der Ribonukleinsäure (**RNA**) zu den Standardaufgaben in biotechnologischen Laboratorien. Sowohl DNA als auch RNA liegen bei prokaryotischen Zellen im Cytoplasma vor (siehe Kap. 2.1.1). Beide Nukleinsäuren haben gemein, dass sie gut wasserlöslich sind und in Alkohol/Wasser-Mischungen als Makromoleküle ausfallen. Die DNA liegt doppelsträngig vor und verhält sich in Lösungen hoch viskos. Die RNA hingegen ist einsträngig und liegt verknäuelte oder in Sekundärstrukturen vor.

Um DNA zu isolieren, können je nach Verwendungszweck mehrere Schritte notwendig sein. Der erste Schritt beginnt mit dem Aufbrechen der Zellen. Dies kann entweder enzymatisch, über Detergenzien oder aber auch durch rein mechanische Einwirkung stattfinden. Anschließend kann entweder direkt isoliert oder Aufreinigungsschritte der wässrigen Probe mit hydrophoben Extraktionsmitteln wie beispielsweise Phenol nachgelagert werden. Abschließend wird mit Alkohol gefällt, getrocknet und in beliebiger Menge wässriger Pufferlösung gelöst.

Bei der RNA-Isolation müssen einige weitere Verhaltensregeln beachtet werden, da sich diese als komplizierter erweist. So muss beispielsweise sehr schnell gearbeitet werden, da in den meisten Zellen stabile RNAsen in großer Anzahl vorkommen, welche die RNA hydrolysieren können. Um diese Enzyme zu deaktivieren, muss denaturiert werden. Das geschieht, indem der Zellaufschluss in eine denaturierende Umgebung überführt wird. Dazu kann eine 4 M Guanidiniumisothiocyanat-Lösung (**GTC**) verwendet werden. Anschließend kann die RNA mittels CsCl-Gradientenzentrifugation von der DNA abgetrennt werden.

### 2.1.5.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (**PCR**) wird dazu genutzt, um Genabschnitte zu vervielfältigen. Durch bekannte Abschnitte werden Primer („20-25 Basen lange Oligonucleotide“) erzeugt, die für den Start der DNA-Synthese benötigt werden. Für die DNA-Synthese werden eine DNA-Polymerase und Desoxynucleosidtriphosphat (**dNTP**) zugegeben.

## 2. Theoretische Grundlagen

In einem (automatisierten) PCR-Gerät laufen dann die eigentlichen Reaktionen zur Vervielfältigung bei verschiedenen Temperaturen ab, welche sich wie folgt gliedern lassen: Denaturierung der doppelsträngig vorliegenden DNA (94-96 °C), Bindung der Primer sowie Polymerisation in 5'-3' Richtung (40-60 °C) und Elongation mit Hilfe eines DNA-Polymerase-Enzyms, welches aus einem hitzestabilen Bakterium erhalten wird (ca. 72 °C). Die so erhaltenen DNA-DNA-Hybride werden erneut denaturiert und der Zyklus beginnt von vorne. Nach mehreren Zyklen liegt die vervielfältigte DNA vor.

### 2.1.5.3 Gelelektrophorese

Eine Möglichkeit Nucleinsäuren aufzutrennen, ist die Gelelektrophorese. Sie ist eine Art der chromatographischen Trennung, welche die unterschiedlichen Ladungszustände und Größen verschiedener Nucleinsäuren sowie deren daraus resultierender Affinität zur stationären Phase (dem Gel) ausnutzt. Dieses Prinzip wird mit Hilfe von Gleichung 2.1 beschrieben.

$$\underline{v} = \frac{z}{6\delta\zeta r} \quad (\text{Gl. 2.1})$$

Mit der spezifischen Mobilität  $\underline{v}$ , der Anzahl der Ladungen pro Molekül  $z$ , der Viskosität des Mediums  $\zeta$  und dem Partikelradius  $r$ . Nach Auftrennung der Basen werden diese unter UV-Licht sichtbar gemacht und ausgeschnitten. Anschließend können diese sequenziert werden.

## 2. Theoretische Grundlagen

### 2.1.5.4 Sequenzierungstechniken

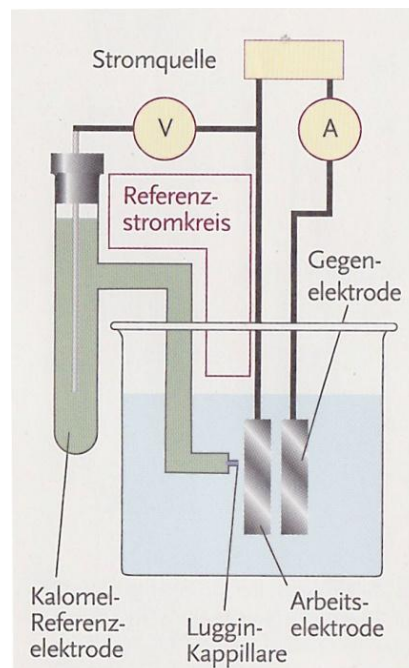
Generell lassen sich die Sequenzierungstechniken in zwei Klassen einteilen. Neben chemischen gibt es auch enzymatische Sequenzierungsmethoden. Erstere beruhen auf der „basenspezifischen chemischen Spaltung eines an einem Ende markierten DNA-Moleküls“. Die enzymatischen Methoden machen sich die Fähigkeit der DNA-Polymerase zu Nutze, radioaktiv markierte oder fluoreszierende Nucleosidtriphosphate einzubauen. Durch die Addition von speziellen Inhibitoren (Didesoxynucleosidtriphosphate, **ddNTP**), denen die notwendige Hydroxylgruppe in 3'-Position fehlt, kommt es dann zum Kettenabbruch.

In der vorliegenden Arbeit kommt die sogenannte Pyrosequenzierung zum Einsatz. Dies ist eine enzymatische Sequenzierungsmethode und eine Variante der Minisequenzierung (nur wenige Nukleotide werden an einem Primer eingefügt und mittels Fluoreszenz detektiert). Der Unterschied zur Minisequenzierung liegt darin, dass anstatt Fluoreszenz die Bildung von frei werdendem Pyrophosphat detektiert wird. Durch den Einsatz des Enzyms Luciferase entstehen Lichtblitze bei Umsetzung des Pyrophosphats, die dann detektiert werden können.

## 2.2 Elektrochemische Grundlagen

### 2.2.1 Drei-Elektroden-Anordnung

Der einfachste Aufbau einer elektrochemischen Zelle kann durch ein galvanisches Element beschrieben werden. Hierbei tauchen zwei Elektroden in eine Elektrolytlösung, zwischen denen sich, bei freiwillig ablaufenden Elektrodenreaktionen, eine elektrische Potentialdifferenz aufbaut <sup>[26]</sup>. In der Praxis wird jedoch meistens mit einer Drei-Elektroden-Anordnung gemessen. Dies ist deswegen notwendig, da keine absoluten Potentiale, sondern diese immer nur in Bezug auf eine ausgewählte Referenz gemessen werden können. In diesem Aufbau werden eine Arbeitselektrode (**AE**), eine Gegenelektrode (**GE**) und eine Referenzelektrode (**RE**) benutzt (Abb. 2.13).



**Abbildung. 2.13:** Aufbau eines Messsystems mit drei-Elektroden-Anordnung (aus <sup>[27]</sup>).

Die RE sollte dabei hochohmig sein, um einen Stromfluss zu verhindern und möglichst dicht an der AE positioniert sein, um den ohmschen Spannungsabfall zu minimieren. Zur Kontrolle der einzelnen Parameter kann ein Potentiostat dienen, der un-

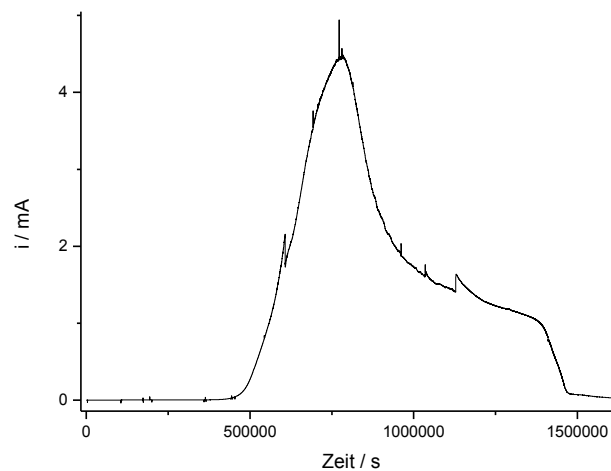


## 2. Theoretische Grundlagen

ter anderem die Soll-Spannung mit der Ist-Spannung vergleicht und regelt <sup>[26]</sup>. Als RE kann eine Normalwasserstoffelektrode dienen, meistens jedoch wird eine Elektrode zweiter Art - beispielsweise eine Ag/AgCl-Elektrode - eingesetzt. Zwischen der AE und der GE wird der Strom, zwischen der AE und der RE wird die Spannung gemessen. Die stromlos betriebene RE dient ebenfalls dazu, das Elektrodenpotential der AE einzustellen.

### 2.2.2 Chronoamperometrie

Bei der Chronoamperometrie (**CA**) wird an der AE ein zeitlich konstantes Potential angelegt <sup>[28]</sup>. Über den gesamten Messzeitraum wird dann der Stromfluss aufgezeichnet und die Zeitabhängigkeit des Stromflusses erhalten (Abb. 2.14).



**Abbildung 2.14:** Beispielhafte Strom-Zeit-Kurve während der Biofilmbildung. Temperatur: 30 °C, angelegtes Potential: 0.2 V (vs. Ag/AgCl), 10 mM Acetat.

Die Gleichung, mit der die Vorgänge an den Elektroden beschrieben werden können, ist die Nernst-Gleichung (Gl. 2.2). Im Allgemeinen gilt diese für reversible Redox-Vorgänge.

## 2. Theoretische Grundlagen

$$E = E^0 + \frac{RT}{zF} \cdot \ln \frac{a_{Ox}}{a_{Red}} \quad (\text{Gl. 2.2})$$

Dabei ist  $E^0$  das Standardpotential des Redox-Paares,  $R$  die allgemeine Gaskonstante,  $z$  die Anzahl der übertragenden Elektronen und  $a_{Ox/Red}$  die Aktivität des Oxidations- bzw. Reduktionsmittels.

Die Chronoamperometrie kann weiterhin auch dazu genutzt werden, um die während eines Experiments tatsächlich geflossene Ladung und darüber die Coulombschen Effektivitäten zu ermitteln. Dazu muss lediglich die Fläche unter der Messkurve durch Integration bestimmt und der Quotient aus tatsächlich geflossener und theoretisch möglicher Ladung ermittelt werden. Zur Ermittlung der *CEs* wurde Analog zu *Chaudhuri & Lovley* vorgegangen <sup>[29]</sup>. Die Berechnung soll beispielhaft unter der Annahme der vollständigen Oxidation von Acetat zu  $\text{CO}_2$  gezeigt werden (Gl. 2.3).



Da ein Mol Elektronen eine Ladung von 96485 C besitzt und pro Mol Acetat acht Elektronen bei der Oxidation frei werden, gilt für 1 Mol/L Acetat die Gleichung 2.4.

$$96485 \text{ [C/L]} \cdot 8 \text{ e}^- \cdot 1 \text{ [L]} = 771880 \text{ [C]} \quad (\text{Gl. 2.4})$$

Die *CEs* ergeben sich aus dem Quotienten der experimentell ermittelten ( $Q_{\text{exp}}$ ) und der theoretischen Ladung ( $Q_{\text{theo}}$ ) (Gl. 2.5).

$$CE = \frac{Q_{\text{exp}}}{Q_{\text{theo}}} \cdot 100 \quad (\text{Gl. 2.5})$$

Für die hier verwendeten Substrate (vgl. Kap. 3.3.1) sind die jeweiligen theoretischen Ladungen in Tabelle 2.1 dargestellt.

## 2. Theoretische Grundlagen

**Tabelle 2.1:** Darstellung der möglichen Ladungsmengen unter der Annahme der vollständigen Oxidation des jeweiligen Substrats zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O.

| Substrat (Konz.: 10 mM/200 mL) | Q <sub>theo</sub> [C] |
|--------------------------------|-----------------------|
| Acetat                         | 1543.8                |
| Lactat                         | 2315.6                |
| Mannitol                       | 5017.2                |
| Zitronensäure                  | 3473.5                |
| Glycerin                       | 2508.6                |
| Ölsäure                        | 19682.9               |
| Toluol                         | 6946.9                |
| Methanol                       | 1543.8                |
| Lävulinsäure                   | 2701.6                |

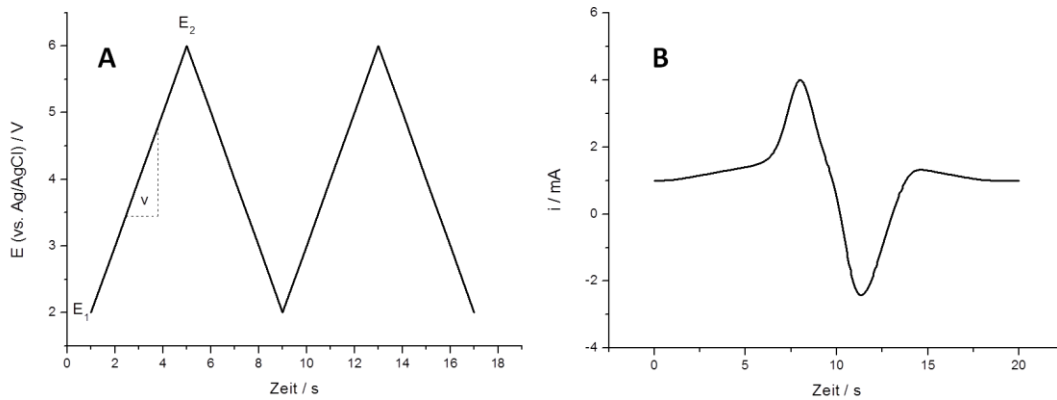
### 2.2.3 Zyklische Voltammetrie

Die Zyklische Voltammetrie (**CV**), auch die „Spektroskopie des Elektrochemikers“ genannt, findet dort Anwendung, wo reversible und irreversible Redoxvorgänge eine Rolle spielen. Dieses Feld erstreckt sich weitläufig und wird als Werkzeug von der organischen-, über die anorganische-, bis hin zur Biochemie verwendet <sup>[30]</sup>.

Jedes sich im Gleichgewicht befindliche elektrochemische System benötigt eine bestimmte Zeit, um sich auf äußere Änderungen einzustellen und sich wieder in einen stationären Zustand zu begeben. Beispiele für äußere Änderungen können Potential-, Strom- oder Konzentrationsänderungen sein. Die zyklische Voltammetrie, auch Dreiecksspannungsmethode genannt, gehört zu den sogenannten quasistationären Methoden <sup>[26]</sup>. Erfolgt eine zeitlich lineare Änderung des an der Arbeitselektrode angelegten Potentials  $E_{WE}$  bezogen auf die Zeit  $t$  nur sehr langsam (abhängig von der gewählten Potentialvorschubgeschwindigkeit), befindet sich das System dadurch ständig nahe am stationären Zustand (Abb. 2.15 **A**). Die äußeren Änderungen sind nur von marginaler Natur. Ausgehend von einem Startpotential  $E_1$  wird die Spannung bis zum Umkehrpotential  $E_2$  linear erhöht und anschließend wieder linear zum Ausgangspotential verringert. Der dabei entstehende Strom wird ebenfalls registriert (Abb. 2.15 **B**). Hier ist zunächst ist kaum ein Stromfluss messbar, dies liegt daran dass zuerst nur ein kapazitiver Strom fließt. Nach einiger Zeit steigt der Stromfluss an

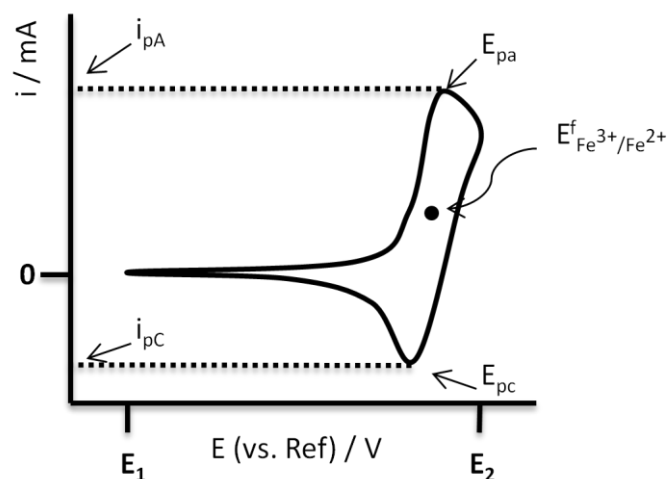
## 2. Theoretische Grundlagen

und gelangt zu einem Maximum. Anschließend fällt der Stromfluss wieder und mündet in einem Minimum, bevor er wieder auf null steigt. Dieser Verlauf ist jedoch durch die Wahl der äußeren Bedingungen geprägt (Ausprägung einer Doppelschicht an der Elektrodenoberfläche, Potentialfenster, etc.)



**Abbildung 2.15:** Zeitlicher Verlauf der Spannungsänderung während der zyklischen Voltammetrie (A) sowie der daraus resultierende Strom (B) (modifiziert aus <sup>[31]</sup>).

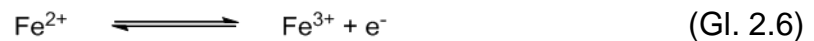
Da beide Kurven Funktionen der Zeit sind, können beide gegeneinander aufgetragen werden. Das Ergebnis dieser Auftragung ist das zyklische Voltammogramm, wie es beispielhaft in Abbildung 2.16 dargestellt ist. Das Aussehen ist dabei charakteristisch für diffusionslimitierte, reversible Systeme.



**Abbildung 2.16:** Beispielhaftes Zyklovoltammogramm einer reversiblen Redoxreaktion (modifiziert aus <sup>[8]</sup>).

## 2. Theoretische Grundlagen

Zyklische Voltammogramme beschreiben, wie sich der Stromfluss mit wechselnder Spannung verändert und erlauben unter anderem Aussagen über die Thermodynamik einer Redoxreaktion, die mit der Nernst-Gleichung beschrieben wird (siehe Gl. 2.3). Wie in Abbildung 2.16 zu erkennen ist, kann aus dem Zykelvoltammogramm ein Oxidations ( $E_{pa}$ )- und ein Reduktionspeak ( $E_{pc}$ ) abgelesen werden, wie es z.B. bei dem System  $Fe^{3+}/Fe^{2+}$  der Fall ist (Gl. 2.6).



Bei Erhöhung der Spannung fließt ein Oxidationsstrom, der sein Maximum beim Gleichgewicht zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Massentransport (bezgl. der Oxidation des  $Fe^{2+}$ ) erreicht. Wird die Spannung wieder verringert, gelangt das System in den reduktiven Bereich und das  $Fe^{3+}$  wird wieder reduziert. Das arithmetische Mittel von Oxidations- und Reduktionspotential wird als Formalpotential  $E^f$  bezeichnet und errechnet sich mit Hilfe von Gleichung 2.7 [31].

$$E^f = \frac{E_{pA} + E_{pC}}{2} \quad (\text{Gl. 2.7})$$

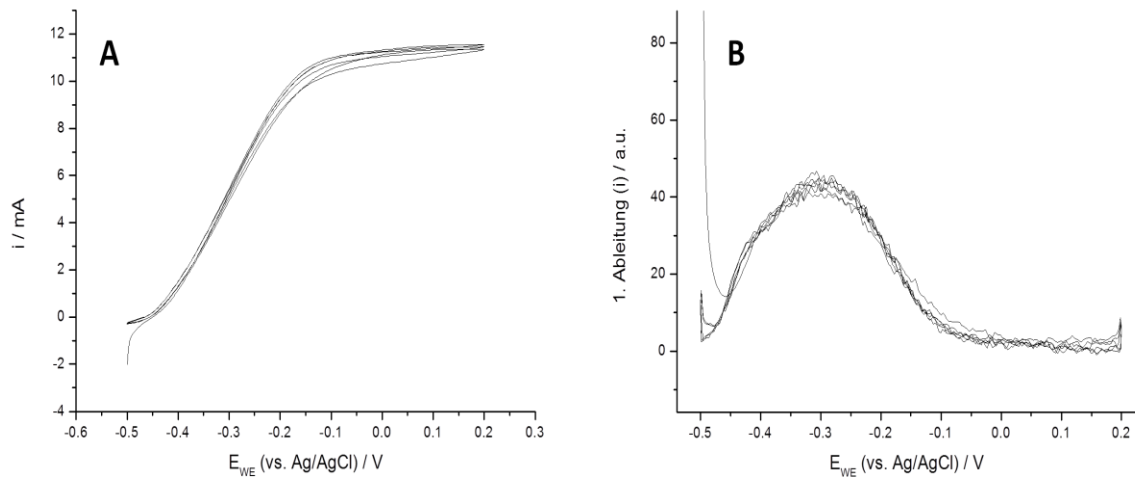
Sind mehrere reversible Redox-Stufen im betrachteten System vorhanden, so kann  $E^f$  für jedes einzelne System ermittelt werden.

### 2.2.4 Zykelvoltammogramme von Biofilmen

Ein wichtiger Aspekt dieser Methode ist, dass die Untersuchungen am lebenden Organismus stattfinden können, ohne ihn abzutöten oder zu verändern. Das bringt den Vorteil, dass die zu untersuchenden Biofilme von der Methode nicht negativ beeinflusst werden und anschließend einfach weiter verwendet werden können. Zykelvoltammogramme, die von Biofilmen aufgenommen werden, lassen sich je nach Bedingungen in zwei Kategorien einteilen. Zum einen sind das CVs unter turnover

## 2. Theoretische Grundlagen

Bedingungen, zum anderen CVs unter non-turnover Bedingungen <sup>[8]</sup>. CVs unter turnover Bedingungen werden erhalten, wenn der Biofilm katalytisch aktiv ist - das heißt, wenn Bioelektrokatalyse stattfindet (Anwesenheit von Substrat). Aus diesen turnover CVs können durch Bilden der ersten Ableitung charakteristische Parameter, wie zum Beispiel das Formalpotential einer bioelektrokatalytischen Reaktion, erhalten werden (Abb. 2.17).

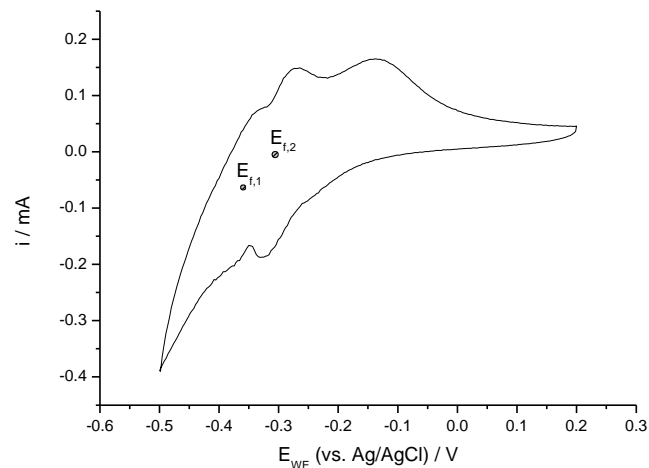


**Abbildung 2.17:** Beispielhaftes CV eines Acetat basierten Biofilms unter turnover Bedingungen (A) sowie die erste Ableitung (B). Scan-rate: 1 mV/s, Potentialfenster: -0.5 – 0.2 V (vs. Ag/AgCl), Temperatur: 35 °C.

Unter optimalen Bedingungen ist für diese CVs die S-Form charakteristisch. Vor allem *Shewanella spec.* zeigen jedoch auch andere, kompliziertere Formen <sup>[32]</sup>.

Im Gegensatz dazu werden non-turnover-CVs unter Bedingungen erhalten, bei denen kein katalytischer Stromfluss messbar ist – das heißt, jeweils nach einem durchlaufenen Zyklus, wenn kein Substrat mehr zur Verfügung steht (Abb. 2.18).

## 2. Theoretische Grundlagen



**Abbildung 2.18:** Beispielhaftes CV eines Acetat basierten Biofilms unter non-turnover Bedingungen. Scan-rate: 1 mV/s, Potentialfenster: -0.5 – 0.2 V (vs. Ag/AgCl), Temperatur: 35 °C.

Hier können, wie bereits in Kapitel 2.2.3 erwähnt, mehrere aktive Redox-Systeme zugeordnet werden. Auffallend in dieser Abbildung sind zwei markante Redox-Systeme, die sich bei -0,298 V und -0.359 V befinden.

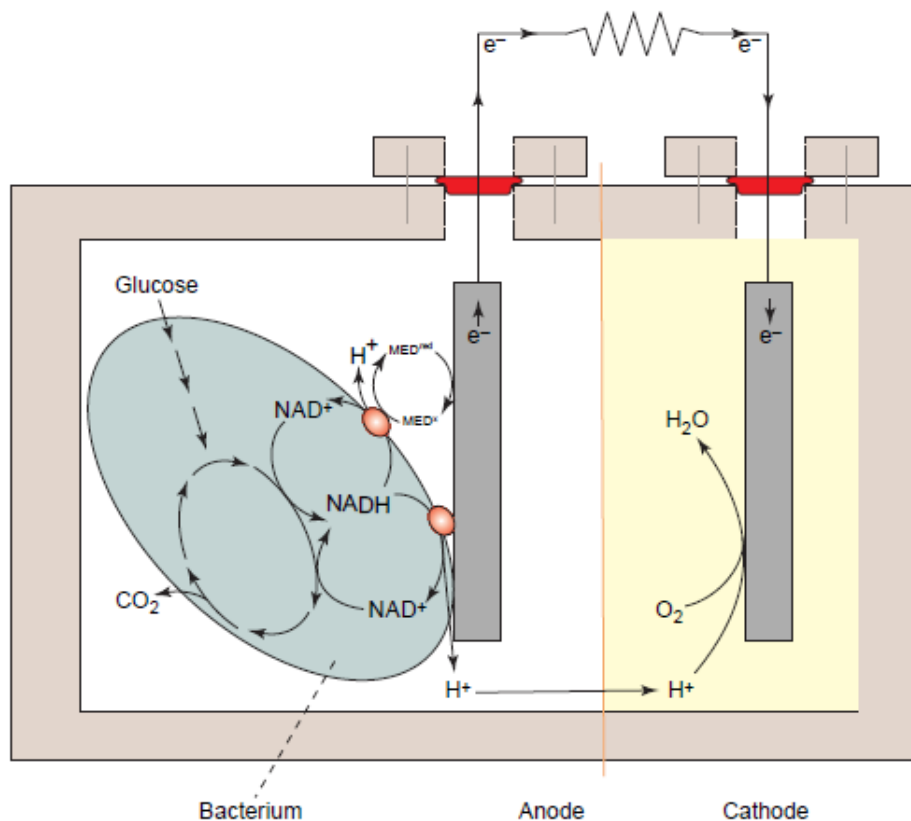
### 2.2.5 Mikrobielle Brennstoffzellen

Mikrobielle Brennstoffzellen (Microbial Fuel Cells, MFCs) nutzen anaerobe Mikroorganismen, um aus organischen oder anorganischen Substanzen Strom zu erzeugen (Abb. 2.19). Dies geschieht, indem die Mikroorganismen die vorhandenen Substrate in ihrem Stoffwechsel katalytisch umsetzen und die darin gespeicherte chemische Energie in elektrische Energie umwandeln <sup>[33]</sup>. Um Mikroorganismen in einer MFC nutzen zu können, müssen diese in der Lage sein, die Elektronen an eine Anode abzugeben. Dies kann unter anderem dadurch realisiert werden, dass eine Elektrode mit einem leicht positiven Potential als Elektronenakzeptor fungiert <sup>[34]</sup>. Durch die Nutzung der Elektrode als externen Elektronenakzeptor können sich Mikroorganismen an der Anode ansammeln und auf dieser einen Biofilm ausbilden (siehe auch Kapitel 2.1.3). Dieser Biofilm steht dann in (direktem) Kontakt mit der Elektrodenoberfläche und kann mit Hilfe der verschiedenen Elektronentransfermechanismen (siehe

## 2. Theoretische Grundlagen

Kapitel 2.1.4) Elektronen abgeben und auf diese Weise z.B. einen externen Verbraucher betreiben.

Um die Ladungsbilanz in der Anoden- und Kathodenkammer auszugleichen, muss in der Kathodenkammer die Reduktion stattfinden. Beispielsweise kann dies durch die Oxidation von Acetat zu Kohlendioxid auf der Anodenseite und die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser auf der Kathodenseite realisiert werden. Die in Abbildung 2.19 dargestellte Zelle ist in Anodenraum (weißer Bereich) und Kathodenraum (gelber Bereich) geteilt.



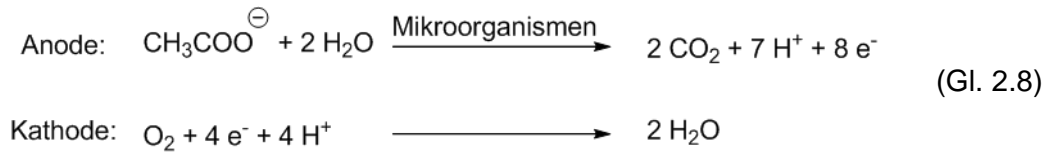
**Abbildung 2.19:** Schematischer Aufbau einer mikrobiellen Brennstoffzelle (aus <sup>[22]</sup>).

Beide Bereiche sind durch eine semipermeable Membran getrennt, die durchlässig für Protonen ist. Die Mikroorganismen (blau) befinden sich in der Anodenkammer. Dargestellt sind zum Einen der direkte Elektronentransfer über den Kontakt mit der Anode und zum Anderen der Transfer mit Hilfe von Redoxmediatoren. Die für die



## 2. Theoretische Grundlagen

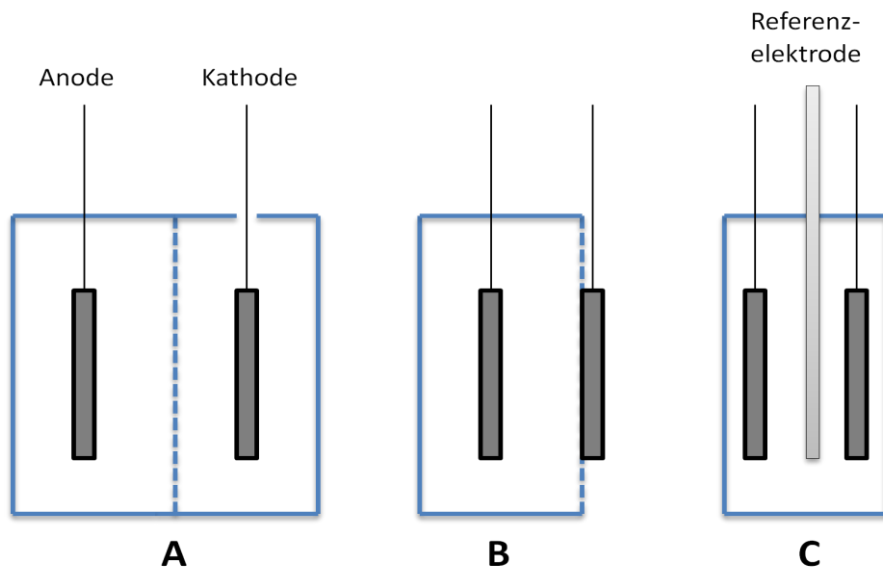
Oxidation von Acetat ablaufenden Reaktionen im Anoden- bzw. Kathodenraum sind in Gleichung 2.8 dargestellt <sup>[38]</sup>.



In MFCs kommen häufig Bakterien der Gattung *Geobacter* zum Einsatz (vgl. Kap 1.1). Ein interessanter Vertreter dieser Gattung ist *Geobacter sulfurreducens*, dessen Genomsequenz bekannt ist und sich daher gut für Analysen eignet. Weiterhin besitzt diese Spezies Eigenschaften, die für den Einsatz in einer MFC von Vorteil sind, denn dieser Organismus benötigt keine externen Redoxmediatoren <sup>[25]</sup>. Auch konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass Biofilme, die aus primärem Abwasser und mit Acetat als Substrat gezogen wurden, weitestgehend aus *Geobacter spec.* bestehen <sup>[35,36,37]</sup>.

Die Leistung einer MFC hängt von mehreren Parametern ab. Darunter fallen beispielsweise die Geometrie der Zelle, die Art der verwendeten Elektroden, das gewählte Substrat oder die Eigenschaften des ausgebildeten Biofilms auf der Elektrode <sup>[38]</sup>. Das in Abbildung 2.19 gezeigte Beispiel einer MFC ist allerdings nicht der einzige Aufbau. Generell gibt es im Labormaßstab mehrere Arten von MFCs (Abb. 2.20).

## 2. Theoretische Grundlagen



**Abbildung 2.20:** Verschiedene Arten einer MFC, Zweikammer-MFC (A), Einkammer-MFC mit Luftkathode (B), potentiostatische Halbzelle (C).

Der in dieser Arbeit verwendete Aufbau ist in Abbildung 2.20 C zu sehen. Hier befinden sich Anode und Kathode zusammen in einer Kammer. Zusätzlich wird noch eine Referenzelektrode verwendet. Die elektrochemischen Untersuchungen finden unter potentiostatischer Kontrolle statt (vgl. Kap. 2.2.1). Da sich die Kathode in diesem Aufbau nicht an der Luft befindet, wird hier anstelle von Wasser Wasserstoff gebildet.

### **2.5 Aus der Literatur bekannte Substrate**

In den vergangenen Jahren wurde eine Reihe an möglichen Substraten, die in einer MFC Verwendung finden könnten, auf ihre Eignung getestet <sup>[39]</sup>. Um eine MFC zukünftig z.B. mit einer Kläranlage zu koppeln, ist es für einen optimalen Betrieb notwendig, die jeweiligen Parameter zu kennen. Neben der Art des Biofilms (Zusammensetzung der mikrobiellen Kultur, Langlebigkeit) spielt das Substrat selbst und dessen Auswirkung auf die Biofilmbildung ebenfalls eine große Rolle. Die Zusammensetzung des Abwassers, welches in eine Kläranlage gelangt, ist seinerseits von verschiedenen Einflüssen abhängig (Tages-/Jahreszeit, Bevölkerungsdichte, Standort der Kläranlage, etc.) und kann stark variieren. Daher ist es in Zukunft wichtig, nicht nur Einzelsubstrate, sondern auch Mischungen zu untersuchen, um die Variabilität eines realen Abwassers möglichst genau nachzuahmen und die wichtigen betrieblichen Faktoren herauszufiltern.

Eine Liste mit einem Auszug von bisher untersuchten Substraten findet sich in Tabelle 2.2.

## 2. Theoretische Grundlagen

**Tabelle 2.2: Kurze Übersicht einiger bisher getesteter Substrate für die Verwendung in einer MFC (modifiziert aus <sup>[39]</sup>).**

| Substrat                       | Konzentration | Inokulum   | Art der MFC   | Autor                       |
|--------------------------------|---------------|--|---|-----------------------------|
| Acetat                         | 1 g/L         | akklimatisierte Bakterien aus einer MFC                              | Einkammer-MFC mit Graphit Elektroden                                    | Logan et al. (2007)         |
| Arabitol                       | 1220 mg/L     | akklimatisierte Bakterien aus einer MFC                              | Einkammer-MFC mit Sauerstoffkathode                                     | Catal et al. (2008b)        |
| Zellulose Partikel             | 4 g/L         | Reinkultur ( <i>Enterobacter cloacae</i> )                           | U-Rohr-MFC mit Graphitelektroden  | Rezaei et al. (2009b)       |
| 1,2-Dichlorethan               | 99 mg/L       | Mischkultur auf Acetat gezogen                                       | Zweikammer-MFC mit Graphitelektroden                                    | Pham et al. (2009a)         |
| Ethanol                        | 10 mM         | Anaerober Klärschlamm aus WWTP                                       | Zweikammer-MFC mit wässriger Kathode                                    | Kim et al. (2007)           |
| Glucose                        | 6,7 mM        | Bakterielle Mischkultur ( <i>Rhodococcus</i> und <i>Paracoccus</i> ) | Einkammer-MFC   | Catal et al. (2008a)        |
| Lactat                         | 18 mM         | Reinkultur <i>S. oneidensis</i> MR-1                                 | Zweikammer-MFC mit Graphitelektroden                                    | Manohar und Mansfeld (2009) |
| Mannitol                       | 1220 mg/L     | akklimatisierte Bakterien aus einer MFC                              | Einkammer-MFC mit Sauerstoffkathode                                     | Catal et al. (2008b)        |
| Phenol                         | 400 mg/L      | aerob aktivierter Schlamm/anaerob aktivierter Schlamm (1:1)          | Zweikammer-MFC mit wässriger Sauerstoffelektrode                        | Luo et al. (2009)           |
| Sorbitol                       | 1220 mg/L     | akklimatisierte Bakterien aus einer MFC                              | Einkammer-MFC mit Sauerstoff-Kathode                                    | Catal et al. (2008b)        |
| Papier Recycling Abwasser      | 2,452 g/L     | Verdünntes Papier Recycling Abwasser                                 | Einkammer-MFC mit Graphit-Bürsten Anode                                 | Huang und Logan (2008)      |
| Schokoladen Industrie Abwasser | 1459 mg/L     | Aktivierter Klärschlamm  | Zweikammer-MFC mit Graphitelektroden                                    | Patil et al. (2009)         |
| Brauerei Abwasser              | 2240 mg/L     | Brauerei Abwasser (unverdünnt)                                       | Einkammer-MFC mit Sauerstoff Kathode                                    | Feng et al. (2008)          |
| Häusliche Abwässer             | 600 mg/L      | Anaerober Klärschlamm  | Zweikammer-MFC, ohne Mediatoren Graphitelektroden (50 cm <sup>2</sup> ) | Wang et al. (2009a)         |

## 2. Theoretische Grundlagen

Wie Tabelle 2.2 zu entnehmen ist, wurden bisher einige Einzelsubstrate (Acetat, Arabitol, Ethanol, Glucose, Lactat, Mannitol, etc.), aber auch verschiedene Abwässer (Papier Recycling, häusliche Abwässer, Brauerei-Abwasser, etc.) untersucht, wobei die Ergebnisse von Substrat zu Substrat stark variieren. Häufig werden vor allem Acetat ( $0.8 \text{ mA/cm}^2$ ) und Lactat ( $0.45 \text{ mA/cm}^2$ ) als Standardsubstrate verwendet<sup>[39,40]</sup>. Einige Alkohole, wie Ethanol ( $0.025 \text{ mA/cm}^2$ ) oder Methanol, wurden ebenfalls getestet, zeigen aber keine hohen Stromdichten. Mannitol, ein Zuckeralkohol, wurde von *Catal et al.* an einem zuvor mithilfe von Acetat angezüchteten Biofilm, getestet und zeigt eine relativ hohe Stromdichte von  $0.58 \text{ mA/cm}^2$ . Mithilfe derselben Methode wurden auch die - in ihrer Struktur dem Mannitol ähnlichen - Zuckeralkohole Arabitol und Sorbitol von *Catal et al.* getestet. Es ergeben sich erwartungsgemäß ähnlich hohe Stromdichten mit Werten von  $0.68$  bzw.  $0.62 \text{ mA/cm}^2$ <sup>[41]</sup>. Auch für Glucose wird unter gleichen Bedingungen eine ähnliche Stromdichte ( $0.7 \text{ mA/cm}^2$ ) erhalten. Was in den oben genannten Studien jedoch fehlt bzw. nicht klar wird, ist die Auswirkung der einzelnen Substrate auf die Biofilmbildung selbst. Es ergeben sich also einige neue Fragestellungen:

Wie wird die Biofilmbildung und dessen Zusammensetzung durch die Nutzung der einzelnen Substrate beeinflusst und welche Stromdichten sind damit möglich? Und vor allem: findet die Bildung eines elektrochemisch aktiven Biofilmes überhaupt statt?

Da die Untersuchung von Einzelsubstraten zwar sehr wichtig ist, um die Grundlagen zu verstehen, aber für den realen Einsatz von möglicherweise begrenzter Aussagekraft sind, rücken vor allem auch „echte“ Abwässer ins Interesse vieler Forscher. Industrieabwässer sowie häusliche Abwässer wurden bereits untersucht. Der Vorteil dieser Abwässer liegt darin, dass sie je nach Sparte aus der sie stammen, eine recht definierte Zusammensetzung aufweisen und somit für eine Summenparameteranalytik gut geeignet sind. Die Stromdichten die hier erreicht wurden reichen von  $0.06 \text{ mA/cm}^2$  für häusliche Abwässer (Tab. 2.2, *Wang et al.*, 2009a), über  $0.2 \text{ mA/cm}^2$  für Brauerei-Abwässer (Tab. 2.2, *Feng et al.*, 2008) bis hin zu  $0.302 \text{ mA/cm}^2$  für Abwässer aus der Schokoladenindustrie (Tab. 2.2, *Patil et al.*, 2009). Alles in allem kann jedoch gesagt werden, dass diese Abwässer, die aus einem Mix an verschiedensten möglichen Substraten bestehen, bisher nicht an die Leistungen heran kommen, die mit Monosubstraten erzielt werden können. Dies

## 2. Theoretische Grundlagen

kann jedoch auch dem Versuchsaufbau (Geometrie der Zelle, Elektrodenmaterial) geschuldet sein.

Besonders unter Berücksichtigung des Aspekts der Nachhaltigkeit ist es wichtig, geeignete Substrate zu finden, die einerseits einen hohen Ertrag an Energie liefern, sich andererseits durch ihren Gebrauch aber auch nicht negativ auf die Umwelt auswirken. Daher sind besonders Substrate von Interesse, die beispielsweise bei technischen Prozessen als Nebenprodukte anfallen und keine weitere Verwendung fänden (z.B. Glycerin).

Weiterhin sollte der Zusammenhang zwischen Coulombscher Effizienz und erreichbarer Stromdichte untersucht werden. Ein Substrat, welches zwar hohe Stromdichten, jedoch nur eine niedrige Coulombsche Effizienzen aufweist, wird kaum nutzbar sein, da der Verlust an Energie schlichtweg zu hoch ist. Deswegen muss möglichst nach Substraten gesucht werden, die hohe Coulombsche Effizienzen bei gleichzeitig hohen Stromdichten liefern können. Eine Modellierung des anodischen Biofilms kann in diesem Zusammenhang ebenfalls eine erhebliche Rolle einnehmen, denn durch die Beeinflussung der molekularen Ökologie können bspw. Synergieeffekte der Mikroorganismen untereinander ausgenutzt werden.

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Verwendete Mikroorganismen und Medien

#### 3.1.1 Verwendete Chemikalien und mikrobielle Mischkultur

Alle verwendeten Chemikalien wurden von Sigma Aldrich oder Roth bezogen und besitzen eine Reinheit von  $\geq 99\%$ , sofern nicht anders angegeben. Als Referenzelektroden wurden Ag/AgCl-Elektroden (ges. KCl, 0.197 V gegen SHE, Sensortechnik Meinsberg GmbH, Deutschland) verwendet. Alle in dieser Arbeit genannten Potentiale beziehen sich auf Ag/AgCl.

Als bakterielle Quelle für die Versuchsreihen wurde primäres Abwasser aus der Kläranlage „Steinhof“ bei Braunschweig verwendet. Dieses flüssige Medium wird direkt hinter dem Rechen der Kläranlage entnommen und besitzt eine vielfältige mikrobielle Mischkultur. Von diesem Abwasser wurden außerdem 500 mL aliquotiert und als Rückstellproben (Stockings) bei  $-80\text{ °C}$  gelagert (siehe auch Kap. 3.3.2).

#### 3.1.2 Künstliches Abwasser

Als Medium für die mikrobiellen Versuche wurde künstliches Abwasser verwendet (Zusammensetzung siehe Tab. 3.1 und 3.2) <sup>[42,43]</sup>.

Tabelle 3.1: Zusammensetzung des künstlichen Abwassers.

| Komponente   | Konzentration in [g/L] |
|--|------------------------|
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O | 2.69                   |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                   | 4.33                   |
| NH <sub>4</sub> Cl                                 | 0.31                   |
| KCl  | 0.13                   |
| Spurenelemente <sup>i</sup>                        | 12.5 [mL/L]            |
| Vitamine <sup>ii</sup>                             | 12.5 [mL/L]            |
| Substrat   | 10 mM                  |

### 3. Material und Methoden

**Tabelle 3.2: Zusammensetzung der Spurenelement-Lösung<sup>i</sup> (links) sowie der Vitamin-Lösung<sup>ii</sup> (rechts).**

| Komponente  | Konzentration<br>[g/L] | Komponente                | Konzentration<br>[mg/L] |
|---|------------------------|---------------------------|-------------------------|
| Nitritotriessigsäure                                | 1.5                    | Biotin                    | 2.0                     |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                | 3.0                    | Folsäure                  | 2.0                     |
| MnSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O                | 0.5                    | Pyridoxinhydrochlorid     | 10.0                    |
| NaCl  | 1.0                    | Thiaminhydrochlorid       | 5.0                     |
| FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                | 0.1                    | Riboflavin                | 5.0                     |
| CoCl <sub>2</sub>                                   | 0.1                    | Nikotinsäure              | 5.0                     |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O                | 0.1                    | DL-<br>Calciumpantothonat | 5.0                     |
| ZnSO <sub>4</sub>                                   | 0.13                   | Vitamin B12               | 0.1                     |
| CuSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O                 | 0.1                    | p-Aminobenzoesäure        | 5.0                     |
| AlK(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>                  | 0.1                    | Liponsäure                | 5.0                     |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | 0.1                    |                           |                         |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 0.1                    |                           |                         |

Des Weiteren werden beim Herstellen der Medien pro 100 mL der künstlichen Abwasserlösung 5 mL primäres Abwasser (siehe 3.1.1) als Inokulum zugegeben.

## 3.2 Verwendete Materialien und Messgeräte

### 3.2.1 Elektrodenpräparation

Zur Herstellung der Arbeits- bzw. Gegenelektroden wurden Graphitstäbe (CP Graphite GmbH, Deutschland) mit 1 cm Durchmesser abgesägt und mit einem Bohrer ein ca. 0.5 cm tiefes Loch (Durchmesser: 1 mm) gebohrt. In dieses Loch wurde ein Edelstahldraht (Goodfellow Cambridge Limited, England) geführt und mit einem Epoxidharz (R & G Faserverbundwerkstoffe, Deutschland) - gemischt mit 0.1 % Graphit - versiegelt. Alle benutzten Elektroden wiesen einen Eigenwiderstand von weniger als 5 Ω auf. Nach jeder abgeschlossenen Messreihe wurden die Biofilme mit Hilfe einer

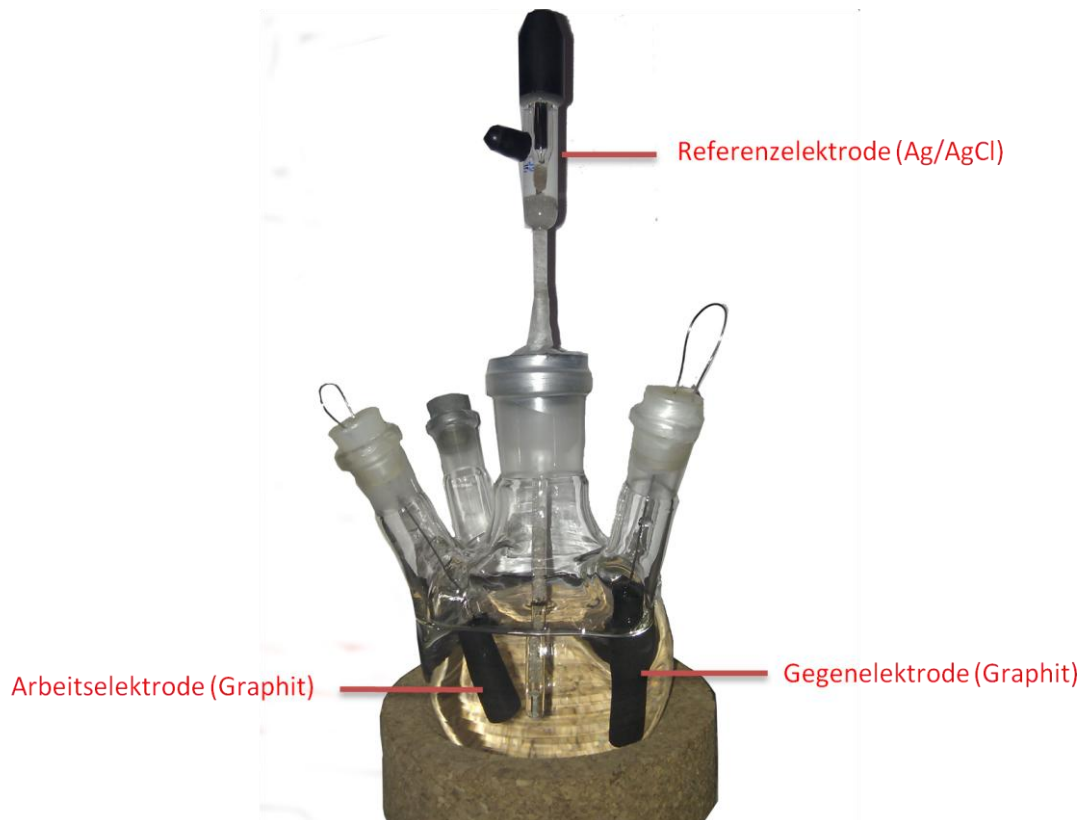


### 3. Material und Methoden

Rasierklinge von der Elektrodenoberfläche geschabt. Danach wurden die Elektroden für ca. 15 Minuten im Ultraschallbad gereinigt und anschließend bei 121 °C autoklaviert (Adolf Wolf SANOclav, Deutschland).

#### 3.2.2 Aufbau der Messzellen

Als Messzellen wurden Fünfhalskolben (250 mL) verwendet, die mit einem Magnetrührkern, einer Arbeits- einer Gegen- und einer Referenzelektrode versehen wurden (Abb. 3.1). Variationen der Temperaturen der verschiedenen Ansätze sind der Kapazität der Inkubatorplätze geschuldet, wurden jedoch an gegebener Stelle kenntlich gemacht.



**Abbildung 3.1:** Aufbau einer Messzelle

### 3. Material und Methoden

#### 3.2.3 Messelektronik

Zur Aufnahme der Chronoamperogramme (die hier erhaltenen Daten dienen der Bestimmung der Coulombschen Effizienzen und der Maximalstromdichten) und der Zyklovoltammogramme (Bestimmung der Formalpotentiale) kam der Potentiostat MPG 2 (BioLogic, Frankreich) zum Einsatz. Die Messungen am Elektrodenhalter wurden mit dem Potentiostaten VMP 3 (BioLogic, Frankreich) durchgeführt. Die Chronoamperogramme wurden bei einem konstanten Potential von 0.2 V (gegen Ag/AgCl) gemessen. Die Zyklovoltammogramme wurden, sofern nicht anders angegeben, im Bereich zwischen -0.5 und 0.2 V mit einer Potentialvorschubgeschwindigkeit (scan-rate) von 1 mV/s aufgezeichnet.

#### 3.2.4 HPLC-Analytik

Der Substratverbrauch wurde mittels HPLC und Brechungsindexdetektor (Spectrasystem P4000, Finnigan Surveyor RI Plus Detektor, Fisher Scientific, Deutschland) kontrolliert. Die verwendete Säule ist eine Hyper-REZXP Carbohydrate H+8 mm (S/N:026/H/012-227). Hierzu wurden die wässrigen Proben mit einem Spritzenfilter steril filtriert (0.2  $\mu\text{m}$ , Phenex, Deutschland), 20  $\mu\text{L}$  auf die Säule gegeben und bei Raumtemperatur vermessen. Dabei wurde 2.5 mM Schwefelsäure mit einem Volumenstrom von 0.5 mL/min als Elutionsmittel verwendet. Die Substratkonzentrationen wurden über die Peakflächen ermittelt. Die Parameter der Kalibrierung finden sich in Tabelle 3.3.

**Tabelle 3.3: Parameter der HPLC-Kalibrierung.**

| Substrat      | RT [min] | Konzentrationsberechnung [mM]           | R <sup>2</sup> |
|---------------|----------|---|----------------|
| Acetat        | ~20.1    | Peakfläche · (1.29 · 10 <sup>-5</sup> ) | 0.9999         |
| Zitronensäure | ~11.3    | Peakfläche · (4.32 · 10 <sup>-6</sup> ) | 0.9998         |
| Glycerin      | ~17.4    | Peakfläche · (4.84 · 10 <sup>-6</sup> ) | 0.9999         |
| Mannitol      | ~13.4    | Peakfläche · (2.11 · 10 <sup>-6</sup> ) | 0.9991         |

### 3.3 Versuchsdurchführung

#### 3.3.1 Screening verschiedener Substrate zur Erzeugung elektrochemisch aktiver Biofilme.

Zum Anwachsen der Biofilme wurden Mehrhalskolben (250 mL) gemäß Kapitel 3.2.2 mit 200 mL des künstlichen Abwassers - versetzt mit 10 mM Substrat - befüllt und ca. 30 Minuten mit Stickstoff gespült um den Sauerstoff zu entfernen. Anschließend wurden die Kolben luftdicht mit Silikonstopfen und Parafilm® verschlossen und an der Arbeitselektrode eine leicht positives Potential von 0.2 V (gegen Ag/AgCl) angelegt. Die geometrische Oberfläche der Arbeitselektroden betrug 13.4 cm<sup>2</sup>. Sofern nicht anders angegeben, waren die Messzellen während der gesamten Versuchsdauer einer konstanten Temperatur von 30 °C ausgesetzt. Von jedem Substrat wurde ein biologisch unabhängiges Replikat erstellt (n = 2 Versuche). Vor jedem Versuch wurden die Medien mit den Substraten mittels Zyklovoltammetrie blind vermessen, um etwaige Störungen ausschließen zu können. Die in den hier beschriebenen Versuchen verwendeten Substrate sind in Tabelle 3.4 dargestellt.

**Tabelle 3.4: Verwendete Substrate in den Substratscreenings.**

| <b>Substrat</b> | <b>Konzentration [g/L]</b> |
|-----------------|----------------------------|
| Acetat          | 0.82                       |
| Lactat (60 %)   | 1.43 [mL/L]                |
| Glycerin (87 %) | 0.85                       |
| Zitronensäure   | 1.92                       |
| Mannitol        | 1.82                       |
| Toluol          | 1.06                       |
| Ölsäure (90 %)  | 3.53                       |
| Methanol        | 0.41                       |
| Lävulinsäure    | 1.16                       |

### 3. Material und Methoden

#### 3.3.2 Biofilmbildung durch Verwendung ausgewählter Substrate

Auf den Versuchen aus Kapitel 3.3.1 basierend, wurden einige Substrate ausgewählt, die anschließend genauer auf biofilmbildende Eigenschaften untersucht wurden. Hierbei dienen die in Kapitel 3.1.1 erwähnten Rückstellproben (je 10 mL) als Inokulum. Der Aufbau der Messzellen ergibt sich aus Kapitel 3.2.2. Die Temperatur betrug 35 °C. Die geometrische Oberfläche der Arbeitselektrode betrug 14.9 cm<sup>2</sup>. Der Stromfluss wurde über die Messdauer von je drei Wachstumszyklen pro Zelle aufgezeichnet. Von jedem Substrat wurde ein biologisch unabhängiges Replikat erstellt (n = 2 Versuche). Die Konzentration an Substraten wurde nach jedem Zyklus mittels HPLC überprüft (außer Ölsäure). Zuletzt wurden die gebildeten Biofilme sowie die planktonischen Zellen im flüssigen Medium nach dem dritten Wachstumszyklus auf ihre mikrobielle Zusammensetzung untersucht.

Dazu wurden die Biofilme unter sterilen Bedingungen von den Arbeitselektroden geschabt und in Zentrifugenröhrchen (15 mL) überführt. Die Proben wurden mit 4 mL 0.9 %iger NaCl-Lösung suspendiert und sechs Reaktionsgefäße (1.5 mL) mit jeweils 0.5 mL Suspension befüllt. Diese Reaktionsgefäße wurden dann mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Die planktonischen Zellen jeder Probe wurden ebenfalls auf insgesamt sechs Reaktionsgefäße verteilt. Hierzu wurden viermal 40 mL des flüssigen Mediums in Zentrifugenröhrchen (50 mL) überführt und bei 4 °C und 4000 rcf (relative centrifugal force) für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und die entstandenen Pellets in 1 mL 0.9 %iger NaCl-Lösung resuspendiert, vereinigt und erneut suspendiert. Auch hier wurde mit je 0.5 mL Suspension befüllt, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Die Proben wurden zur DNA- und RNA-Sequenzierung an das Institut für Geobiologie der Georg-August-Universität Göttingen (Arbeitskreis Prof. Dr. R. Daniel) geschickt. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen: DNA-Isolation, 16S PCR, Gelextraktion, Pyrosequenzierung.

Zur Extraktion der DNA und RNA wurden die Isolationskits „PowerBiofilm™ DNA Isolation Kit“ bzw. „PowerBiofilm™ RNA Isolation Kit“ (MO-BIO, USA) benutzt. Zur Vorbereitung der Proben für die 16S PCR wurden folgende Medien angesetzt (Tab. 3.5):

### 3. Material und Methoden

**Tabelle 3.5: Medien für die DNA- und RNA-Sequenzierungen. Links DNA, rechts RNA.**

|      |    |                                   |      |    |                                   |
|------|----|-----------------------------------|------|----|-----------------------------------|
| 10   | μL | 5x Phusion GC Buffer              | 10   | μL | 5x Phusion GC Buffer              |
| 1    | μL | Primer for (1:10)                 | 1    | μL | Primer for (1:10)                 |
| 1    | μL | Primer rev (1:10)                 | 1    | μL | Primer rev (1:10)                 |
| 0.15 | μL | MgCl <sub>2</sub>                 | 0.15 | μL | MgCl <sub>2</sub>                 |
| 2.5  | μL | DMSO (5%)                         | 2.5  | μL | DMSO (5%)                         |
| 1    | μL | dNTPs (10 mM)                     | 1    | μL | dNTPs (10 mM)                     |
| 0.5  | μL | Phusion HF DNA Polymerase (2U/μL) | 0.5  | μL | Phusion HF DNA Polymerase (2U/μL) |
| x    | μL | template (50 ng)                  | 2.0  | μL | template cDNA                     |
| x    | μL | dd H <sub>2</sub> O               | 31.9 | μL | dd H <sub>2</sub> O               |
| 50   | μL |                                   | 50   | μL |                                   |

Hierbei ist von besonderer Bedeutung, dass die verwendete DNA-Polymerase „Phusion HF DNA Polymerase“ als „proof-reading“ bezeichnet wird. Als vorwärts- und rückwärts-Primer wurden die Primer V3for-L (5'-**CCATCTCATCCCTGCGTGTCTC-CGACTCAGACGACTACAGTACGGRAGGCAGCAG**-3')<sup>[44]</sup> sowie V5rev-L (5'-**CCT-ATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGCCGTCAATTCMTTGTAGT**-3')<sup>[45]</sup> verwendet.

Zur Generierung der Amplicons wurden folgende 16S PCR Einstellungen vorgenommen: Denaturation für 5 min bei 98 °C, 25 Zyklen 45 s Denaturierung bei 98 °C, Primerhybridisierung für 45 s bei 60 °C, Elongation für 30 s bei 72 °C. Anschließend erfolgte eine weitere Elongation für 5 min bei 72 °C und letztlich eine Abkühlung auf 10 °C.

Die erhaltenen Daten aus der Pyrosequenzierung wurden mit der Datenbank „QIIME“ verglichen und die Sequenzen bei einer Übereinstimmung ≥97 % einer Spezies zugeordnet. Letztlich erfolgten die statistischen Auswertungen mit der Software „R“.

### 3. Material und Methoden

#### 3.3.3 Untersuchungen an Mischsubstraten

Der Aufbau der Messzellen ergibt sich aus Kap.3.2.2. Jedoch wurden hierbei die in Kapitel 3.3.2 verwendeten Substrate (außer Ölsäure) untereinander so variiert, dass jeweils zwei Substrate als Kohlenstoffquelle angeboten werden. Dabei betrug die Konzentration der einzelnen Substrate jeweils 5 mM, insgesamt standen in jeder Zelle also 10 mM Substrat zur Verfügung. Der Abbau der Substrate wurde nach jedem Zyklus mittels HPLC überprüft. Die Substratvariationen sind in Tabelle 3.6 dargestellt.

**Tabelle 3.6: Substratvariationen der Untersuchungen an Mischsubstraten.**

| <b>Substrate</b>         |
|--------------------------|
| Acetat / Glycerin        |
| Acetat / Zitronensäure   |
| Acetat / Mannitol        |
| Glycerin Mannitol        |
| Glycerin / Zitronensäure |
| Zitronensäure / Mannitol |

#### 3.3.4 Untersuchungen an realen Abwässern

Der Aufbau der Messzellen ergibt sich aus Kap.3.2.2. Die Kolben wurden mit 190 mL realem Abwasser und 10 mL primärem Abwasser versetzt und bei 35 °C inkubiert. Die aktive Oberfläche der Arbeitselektroden betrug 13.4 cm<sup>2</sup>. Die verwendeten Abwässer sowie die dazugehörigen Parameter finden sich in Tabelle 3.7.

**Tabelle 3.7: Verwendete reale Abwässer sowie einige Parameter vor den Messungen.**

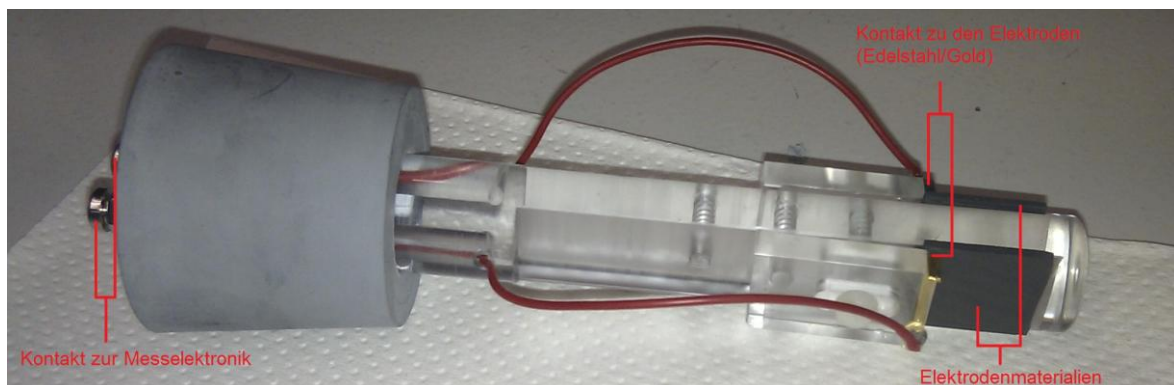
| <b>Abwasser</b>              | <b>Leitfähigkeit [mS]</b> | <b>pH</b> | <b>COD [mg O<sub>2</sub>/L]</b> |
|------------------------------|---------------------------|-----------|---------------------------------|
| Zentratwasser (vor Faulung)  | 3.8                       | 5.57      | 4449                            |
| Zentratwasser (nach Faulung) | 8.5                       | 8.32      | 684                             |
| Ablauf Vorklärung            | 1.4                       | 7.22      | 170                             |
| Gelbwasser                   | 30.9                      | 9.41      | 4680                            |

### 3. Material und Methoden

Hierbei wurden die Abwässer „Zentratwasser (vor Faulung) bzw. (nach Faulung)“ sowie „Ablauf Vorklärung“ von der Kläranlage Steinhof (siehe Kap. 3.1.1) bezogen. das „Gelbwasser“ stammt aus dem Institut für Siedlungswasserwirtschaft der TU Braunschweig.

#### 3.3.5 Entwicklung eines Elektrodenhalters zur Untersuchung verschiedener Elektrodenmaterialien

Ein Mehrhalskolben (350 mL) wird analog Kapitel 3.2.2 mit 300 mL des künstlichen Abwassers versetzt. Als Arbeitselektrode diente hier ein neu entwickelter Elektrodenhalter (Institut für Halbleitertechnik, TU Braunschweig, Arbeitskreis Prof. Dr. A. Waag), in den jeweils zwei Elektroden eingespannt werden können (Abb. 3.2). Der Korpus des Elektrodenhalters wurde aus Plexiglas gefertigt.



**Abbildung 3.2:** Aufbau des in den Experimenten verwendeten Elektrodenhalters.

Der Kontakt zu den Elektrodenmaterialien ist auf der einen Seite durch ein Goldblech gesichert, auf der anderen Seite wurde Edelstahl zur Kontaktierung verwendet. Als Substrat wurde Acetat in einer Konzentration von 10 mM ausgewählt. Die Temperatur betrug 35 °C. Während der Experimente konnten die Elektroden durch Umstecken der Kontakte einzeln angesteuert und vermessen werden. Als Elektrodenmaterialien wurden Graphit (CP Graphite GmbH, Deutschland), Edelstahl (Werkstoffnummer 1.4301) und Galliumnitrid beschichtete Saphirplatten (Institut für Halbleitertechnik, TU Braunschweig, Arbeitskreis Prof. Dr. A. Waag) verwendet.

## 4. Ergebnisse und Auswertung

### 4.1 Screening verschiedener Substrate

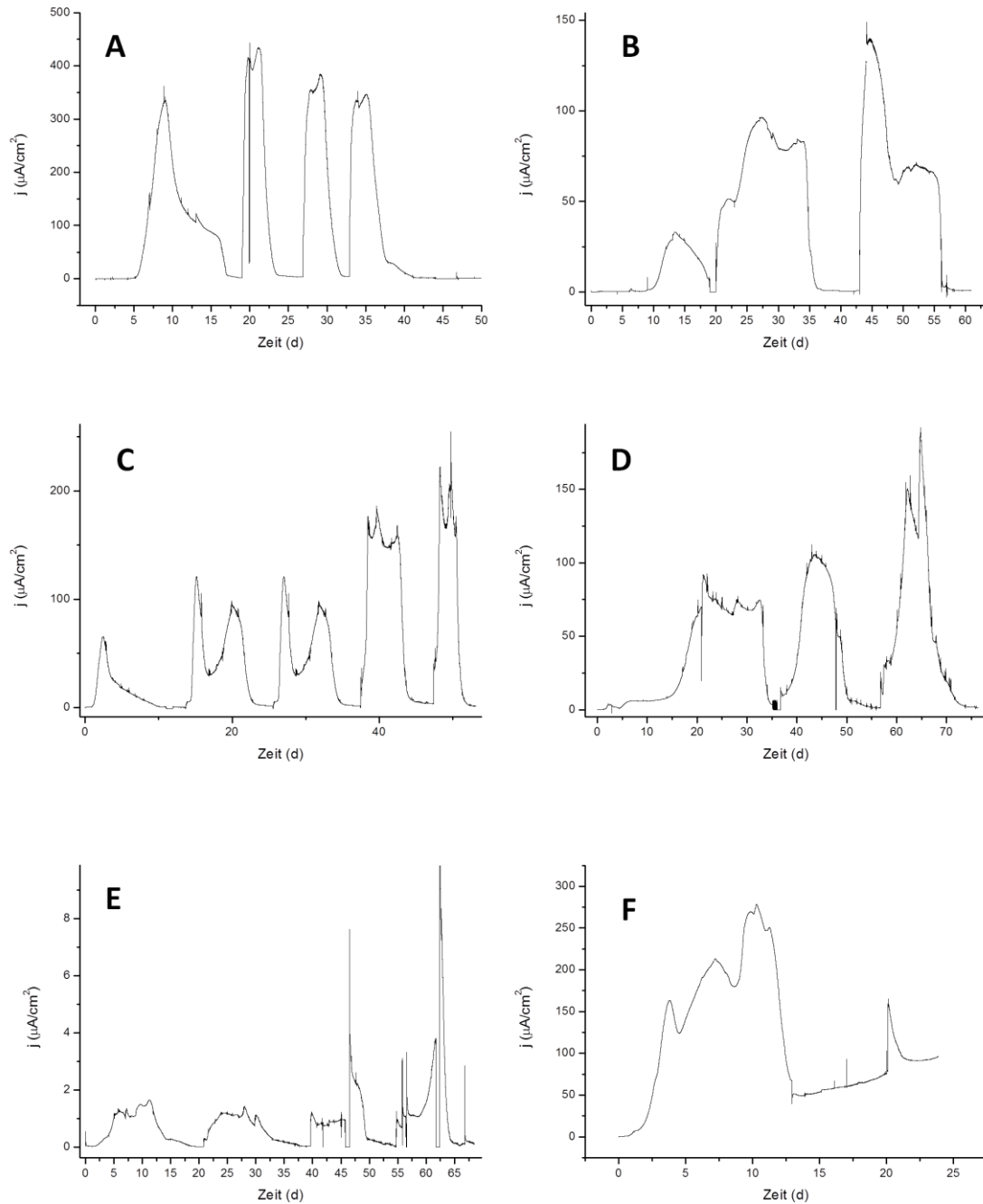
Konsortien von Mikroorganismen sind „wahrliche Stoffwechselmeister“ und sind in der Lage verschiedenste Substrate zu verwerten (siehe Kap. 2.1.2). Diese Arbeit befasst sich mit Grundlagenaspekten für mikrobielle Brennstoffzellen, die künftig diverse komplexe Substrate verwerten sollen, da sie beispielsweise in eine Kläranlage integriert werden. In realen Abwässern finden sich eine Vielzahl verschiedener Klassen von potentiellen Elektronendonoren, darunter Zucker, Fette, organische Säuren oder aber auch anorganische Stoffe wie Sulfide <sup>[19]</sup>. Um dieses breite Spektrum an unterschiedlichsten Substraten abzudecken, wurden neun ausgewählte Substrate verschiedener Stoffklassen in einer Voruntersuchung sowohl auf ihre Biofilm bildenden Eigenschaften, als auch auf die dadurch mögliche Stromproduktion ( $j_{\max}$ ) sowie auf die erreichbaren Coulombsche Effizienzen ( $CE$ ) hin, untersucht. Die verwendeten mikrobiellen Inokuli stammten aus dem kommunalen Abwasser (vgl. Kap. 3.1.1).

Um sicher zu stellen, dass die Substrate bei den zykelvoltammetrischen Untersuchungen elektrochemisch inaktiv sind, wurde jedes Substrat blind (ohne Inokulum) vermessen. Lediglich Methanol wurde unter den angegebenen Bedingungen elektrochemisch umgesetzt.

Eine Auswahl der Strom-Zeit-Kurven, die von den verschiedenen Substraten aufgenommen wurden, findet sich in den Abbildungen 4.1a und 4.1b.

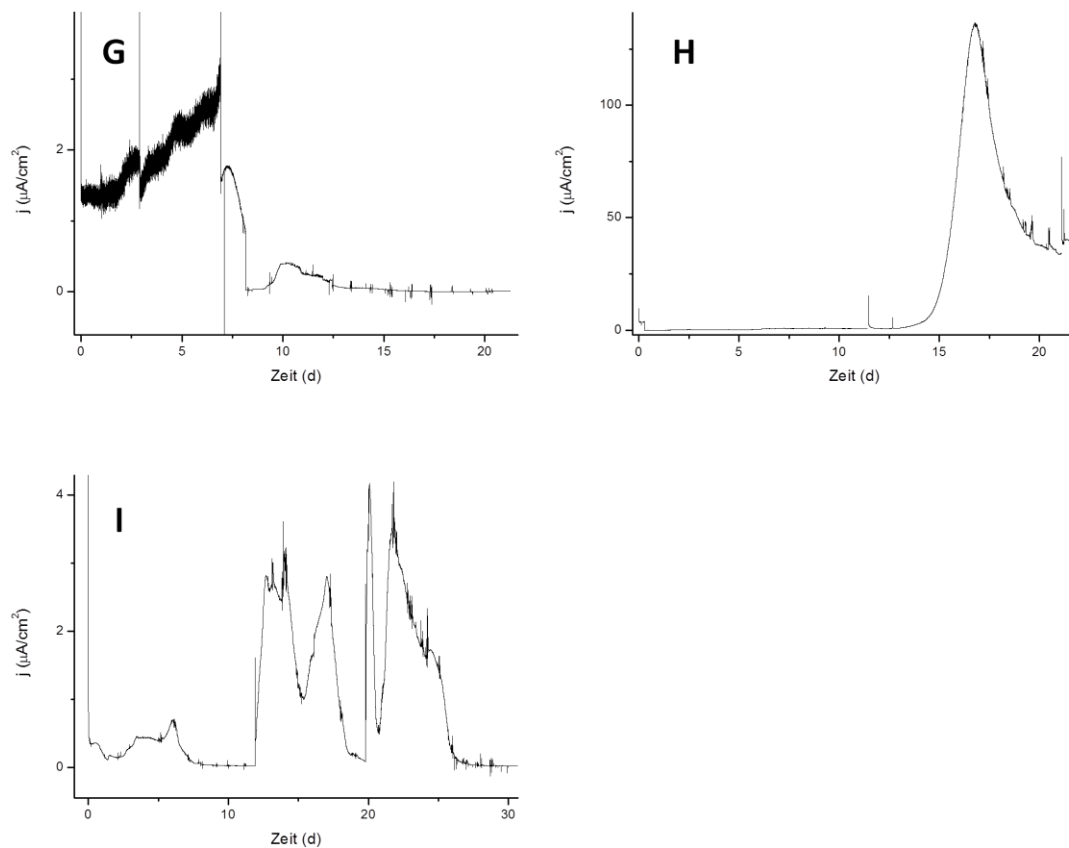


## 4. Ergebnisse und Auswertung



**Abbildung 4.1a:** Ausgewählte Strom-Zeit-Kurven ( $0.2\text{ V vs. Ag/AgCl}$ ) aus den Substratscreenings. Substratkonzentration:  $10\text{ mM}$ . Sofern nicht anders angegeben, betrug die Temperatur  $30\text{ }^\circ\text{C}$ . Zu sehen sind die Daten für Acetat (A), Lactat (B), Glycerin ( $35\text{ }^\circ\text{C}$ ) (C), Zitronensäure ( $35\text{ }^\circ\text{C}$ ) (D), Lävulin-säure ( $35\text{ }^\circ\text{C}$ ) (E) und Mannitol (F). Als Inokulum wurde primäres Abwasser verwendet.

## 4. Ergebnisse und Auswertung



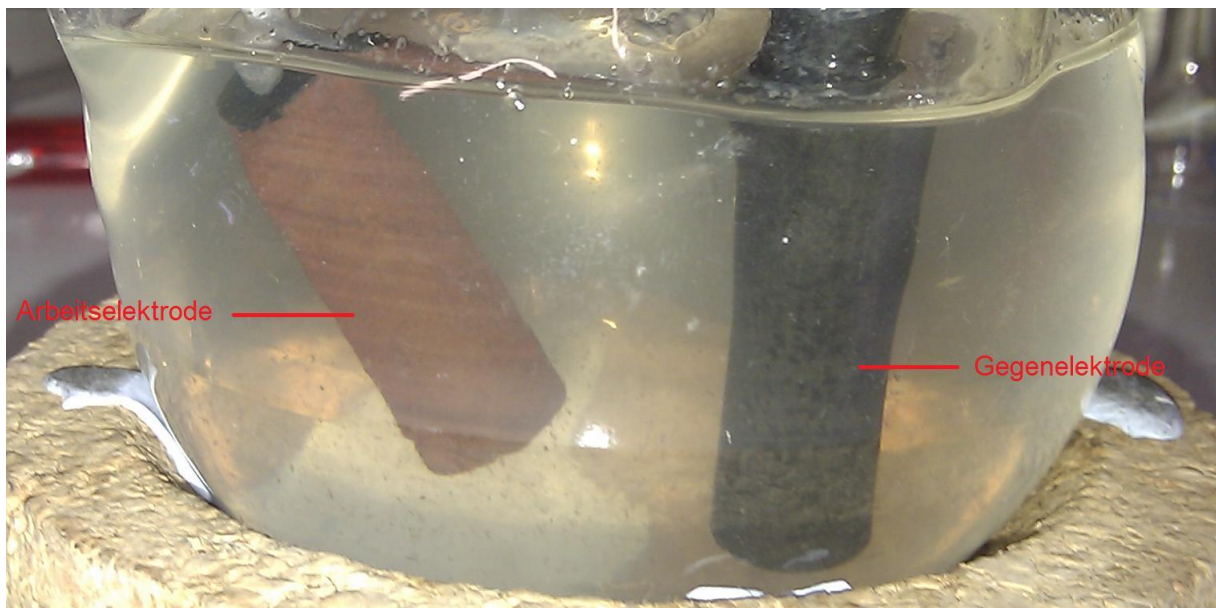
**Abbildung 4.1b:** Ausgewählte Strom-Zeit-Kurven (0.2 V vs. Ag/AgCl) aus den Substratscreenings. Substratkonzentration: 10 mM. Sofern nicht anders angegeben, betrug die Temperatur 30 °C. Zu sehen sind die Daten für Methanol (G), Ölsäure (H) und Toluol (I). Als Inokulum wurde primäres Abwasser verwendet.

Die Strom-Zeit Kurven aus den Abbildungen 4.1a und 4.1b wurden in einem Zeitraum von mindestens 20 Tagen pro Substrat aufgenommen. Wie aus den Kurven zu erkennen ist, wurden die jeweiligen Medien nach dem Verbrauch eines Substrates mehrmals erneuert. Charakteristisch für jede der gezeigten Kurven ist, dass jeweils der erste Zyklus deutlich länger dauert, als die nachfolgenden. Dies ist dadurch zu erklären, dass die Mikroorganismen zunächst die Adaptionsphase durchlaufen. Diese müssen sich erst an die veränderten Begebenheiten gewöhnen, ehe sich das mikrobielle Wachstum einstellt (vgl. Kap 2.1.1). Eine Zusammenfassung der elektrochemischen Parameter findet sich in Tabelle 4.1.

Unter den ausgewählten Substraten sind Acetat (Abb. 4.1 A) und Lactat (Abb. 4.1 B) die in der Literatur am häufigsten angewandten Substrate, sodass hierzu viele Er-

#### 4. Ergebnisse und Auswertung

gebnisse über die zu erwarteten Stromdichten und Coulombschen Effizienzen vorliegen. Beide Substrate zeigten erwartungsgemäß hohe Stromdichten, wobei bei der Verwendung von Lactat etwas niedrigere Stromdichten gemessen wurden. Nach einigen Wachstumszyklen bildete sich bei beiden Substraten ein rötlich-brauner Biofilm auf den Arbeitselektroden aus (Abb. 4.2). Der Anteil der planktonischen Zellen war jedoch bei Lactat höher als bei Acetat.



**Abbildung 4.2:** Beispielhafter Biofilm auf Basis von Acetat als Substrat.

Die *CEs* reichten hier bis 90.7 % bei Acetat heran. Lactat lieferte etwas geringere *CEs* bis 65.2 %, was auch den Erwartungen entspricht (vgl. Kap 2.1.2.5).

Glycerin (Abb. 4.1 **C**) zeigte sich ebenfalls als geeignetes Substrat für die Verwendung in einer MFC. Hier betrug die Messtemperatur 35 °C und es wurden Maximalstromdichten gemessen, die zwischen denen von Acetat und Lactat lagen. Hierbei fielen die *CEs* jedoch deutlich niedriger aus und lagen bei ca. 30 %. Auch hier bildete sich ein rötlich/brauner Biofilm aus, welcher allerdings etwas weniger farbintensiv war. Es wurden nur wenige planktonische Zellen gebildet. Bereits *Nimje et al.* konnten Glycerin erfolgreich als Elektronendonator nutzen und erreichten *CEs* um 23 %. Als bakterielle Quelle wurde hier jedoch *Bacillus subtilis* (BBK006) in Reinkultur verwendet, die vorher mit Glycerin kultiviert wurde <sup>[46]</sup>. In der Literatur ist ebenfalls bekannt,

#### 4. Ergebnisse und Auswertung

dass Glycerin ab einer bestimmten Konzentration eine biozide Wirkung ausübt, was auch hier einen hemmenden Effekt auf den Biofilm ausüben könnte <sup>[47]</sup>.

Ebenfalls eine gute Verwendbarkeit zeigte die Zitronensäure (Abb. 4.1 D). Auch hierbei wurde bei einer konstanten Temperatur von 35 °C gemessen. Nach drei Wachstumszyklen wurden Stromdichten erreicht, die durchaus in der Größenordnung von Lactat lagen. Es ergaben sich *CEs* um ca. 30 %. Die Tatsache, dass die *CEs* bei der Zitronensäure ein wenig höher lagen als bei Glycerin ist wahrscheinlich darin begründet, dass Zitronensäure direkt im Citratzyklus verstoffwechselt werden kann und dadurch der Energieaufwand für die Mikroorganismen geringer ist. *Xu* und *Liu* konnten in einer MFC mit Acetat als Substrat unter anaeroben Bedingungen *Citrobacter spec.* aus Abwasser isolieren. Mit diesen *Citrobacter spec.* wurde anschließend eine MFC inokuliert und Natriumcitrat (30 mM) als Substrat angeboten. Es konnten bei einer Temperatur von 30 °C Stromdichten um 9.8  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  erreicht werden <sup>[48]</sup>. Im Vergleich mit den bisher hier gewonnenen Ergebnissen fallen die erzeugten Stromdichten wesentlich niedriger aus. Dies kann unter anderem daran liegen, dass *Citrobacter spec.* alleine keine hohen Elektronentransferraten liefern. Des Weiteren konnten keine *Citrobacter spec.* in den folgenden Arbeiten nachgewiesen werden (vgl. Kap. 4.2).

Lävulinsäure (Abb. 4.1 E), die in der technischen Industrie vielfach Verwendung findet (Plattformchemikalie, Druckerfarben, Batteriebestandteile) und aus Biomasse hergestellt werden kann <sup>[49]</sup>, zeigte ihrerseits keine gute Verwendbarkeit. Nach vier Wachstumszyklen bei 35 °C stiegen die Stromdichten nicht über 4  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  und die *CEs* lagen in einem sehr niedrigen Bereich unter 1 %. Nach 70 Tagen Versuchsdauer konnte keine Biofilmbildung beobachtet werden.

Zwei Substrate, die beide keine gute Verwendbarkeit zeigten sind Methanol (Abb. 4.1 G) und Toluol (Abb. 4.1 I). Bei den Messungen mit Methanol ließen sich nur veräuschte und nicht gut auswertbare Chronoamperogramme erhalten. Die maximale Stromdichte lag hier gerade einmal bei rund 3  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  und damit in der Größenordnung der Lävulinsäure. Obwohl Methanol eine gute Wasserlöslichkeit aufweist, kann es sein, dass durch die Flüchtigkeit dieser Verbindung ein gewisser Teil in die Gasphase übergegangen ist und somit den Mikroorganismen nicht zur Verfügung stand. Da Methanol aus einem C<sub>1</sub>-Körper besteht, ist es denkbar, dass die Mikroor-

#### 4. Ergebnisse und Auswertung

ganismen aus dem primären Abwasser diesen Elektronendonator nicht verwerten können. Weiterhin ist bekannt, dass Methanol in der Methanogenese – eine Konkurrenzreaktion, die in einer MFC ablaufen kann – zur Methanbildung dient <sup>[8]</sup>. Dadurch wird das Methanol unabhängig von der Stromproduktion verstoffwechselt, wodurch sich auch die *CEs* verringern. Die hier gewonnenen Erkenntnisse decken sich auch mit Ergebnissen, die *Kim et al.* gemacht haben. Hier wurde versucht Ethanol und Methanol mit anaerobem Faulschlamm in einer Zweikammer-MFC (Nafion™ Membran) oxidativ umzusetzen. Lediglich Ethanol konnte erfolgreich zur Stromerzeugung genutzt werden. Als Grund für die schlechte Verwendbarkeit von Methanol wird die langsame Abbauraten der Alkohol Dehydrogenase angegeben <sup>[50]</sup>. Die Nutzung von Toluol als Substrat wurde bereits von *Friman et al.* untersucht. Dieses Substrat wurde durch eine Reinkultur von *Pseudomonas putida* F1 oxidativ verstoffwechselt und es wurden dabei Stromdichten bis zu  $9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  generiert <sup>[51]</sup>. In dieser Arbeit konnten durch die Verwendung von Toluol keine nennenswerten Ströme erzeugt werden. Weiterhin ist bekannt, dass Toluol dazu benutzt wird, um Biofilme durchlässig zu machen, indem die Cytoplasmamembran der Mikroorganismen zerstört wird <sup>[19]</sup>. Das würde in einer MFC dazu führen, dass sich ein Biofilm gar nicht erst ausbildet und die Leistung sinkt. Außerdem sind die Metabolite, die beim Abbau von Toluol gebildet werden schädlich.

Als Vertreter der Fettsäuren wurde Ölsäure (Abb. 4.1 H) verwendet. In dieser ersten Messreihe konnten Stromdichten im Bereich von Lactat gemessen werden. Dieses Ergebnis scheint zunächst nicht den Erwartungen zu entsprechen, da davon ausgegangen werden kann, dass Ölsäure, durch die lange C<sub>18</sub>-Kette, ein schwer abbaubares Substrat ist. Dies bestätigte sich auch durch die ungewöhnlich lange lag-Phase (ca. 15 Tage) in der Messkurve. Nach der gesamten Messdauer war jedoch zu erkennen, dass sich auch hier kein Biofilm ausgebildet hat. Allerdings ist das Medium deutlich getrübt gewesen, was auf eine hohe Anzahl an planktonischen Zellen hindeutet. In der Literatur wurden bisher eher kurzkettige Carbonsäuren (Buttersäure, Valeriansäure) als Substrate in MFCs genutzt. So konnten *Choi et al.* zeigen, dass die Leistung einer MFC umso niedriger ist, je länger die C-Kette des verwendeten Substrates ist. Acetat zeigte dort die beste Leistung, wohingegen die Leistung über Buttersäure (C<sub>4</sub>) bis hin zu Valeriansäure (C<sub>5</sub>) stetig abnahm <sup>[52]</sup>. So bestätigen auch die hier erreichten Ergebnisse diesen Trend.

#### 4. Ergebnisse und Auswertung

Als letztes Substrat wurde Mannitol, ein Zuckeralkohol, verwendet (Abb. 4.1 F). Hier wurde eine gute Biofilmbildung beobachtet (ebenfalls leicht rötlich, mit einer hohen Anzahl an planktonischen Zellen), was sich mit der gemessenen Stromdichte im Bereich von Glycerin deckt. Die  $CE$  lag hier bei ca. 44.9 % und damit etwas über den Werten für Zitronensäure und Glycerin. Bereits *Catal et al.* haben in einer Einkammer-MFC mit Luftkathode Mannitol als Substrat angeboten und Stromdichten um  $580 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  generieren können (häusliches Abwasser als Inokulum,  $32 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Damit liegen die erreichten Stromdichten etwa doppelt so hoch wie es hier der Fall ist (vgl. Tab. 4.1). Jedoch wurde bei *Catal* eine höhere Inkubortemperatur gewählt, was durchaus einen Einfluss auf die generierten Stromdichten haben kann (vergleiche auch *Patil et al.* <sup>[54]</sup>).

Die aus den Substratscreenings ermittelten elektrochemischen Parameter sind zusammenfassend in Tabelle 4.1 dargestellt.

**Tabelle 4.1: Übersicht über die ermittelten elektrochemischen Parameter aus den Substratscreenings. Die Zahlen hinter den Substraten geben die laufenden Nummern an. Hierbei steht die Nummer „2“ für ein biologisch unabhängiges Replikat.**

| Versuch         | Maximalstromdichte<br>$j_{\text{max},\emptyset} [\mu\text{A}/\text{cm}^2]$ | $CE_{\emptyset} [\%]$ | n<br>( $j_{\text{max}}$ ) | n<br>(CE) | T<br>[ $^\circ\text{C}$ ]             | Geeignet |
|-----------------|--|-----------------------|---------------------------|-----------|---------------------------------------|----------|
| Acetat 1        | $388.7 \pm 44.1$   | $88.7 \pm 2.1$        | 3                         | 3         | <b>30 <math>^\circ\text{C}</math></b> | √        |
| Acetat 2        | 205.9  | 41.6                  | 2                         | 2         | <b>30 <math>^\circ\text{C}</math></b> | √        |
| Glycerin 1      | $210.9 \pm 34.7$   | $31.3 \pm 9.3$        | 2                         | 2         | 35 $^\circ\text{C}$                   | √        |
| Glycerin 2      | $260.7 \pm 52.7$   | $19.1 \pm 4.1$        | 2                         | 2         | 35 $^\circ\text{C}$                   | √        |
| Zitronensäure 1 | 192.3  | $38.3 \pm 2.7$        | 1                         | 2         | 35 $^\circ\text{C}$                   | √        |
| Zitronensäure 2 | 95.9   | 23.6                  | 1                         | 1         | 35 $^\circ\text{C}$                   | √        |
| Mannitol 1      | 278.1  | 44.9                  | 1                         | 1         | <b>30 <math>^\circ\text{C}</math></b> | √        |
| Ölsäure 1       | 135.8  | 2.6                   | 1                         | 1         | 35 $^\circ\text{C}$                   | (√)      |
| Lactat 1        | 139.9  | $55.2 \pm 0.5$        | 1                         | 2         | <b>30 <math>^\circ\text{C}</math></b> | √        |
| Lactat 2        | 149.8  | 65.2                  | 1                         | 1         | <b>30 <math>^\circ\text{C}</math></b> | √        |
| Lävulinsäure    | 3.8  | $0.52 \pm 0.02$       | 1                         | 3         | 35 $^\circ\text{C}$                   | X        |
| Methanol        | 3.2  | /                     | 1                         | /         | <b>30 <math>^\circ\text{C}</math></b> | X        |
| Toluol          | $3.7 \pm 0.7$  | 0.21                  | 2                         | 2         | <b>30 <math>^\circ\text{C}</math></b> | X        |

#### 4. Ergebnisse und Auswertung

Wie aus Tabelle 4.1 ersichtlich, eignen sich mehrere der verwendeten Substrate zur Nutzung in einer MFC. Darunter fallen Acetat, Lactat, Glycerin, Zitronensäure, Mannitol und Ölsäure. Vor allem aber Lävulinsäure, Methanol und Toluol scheinen unter den hier getesteten Elektronendonoren nicht geeignet zu sein und finden keine weitere Verwendung. Aus den bisher gewonnenen Erkenntnissen wurden anschließend fünf Substrate ausgewählt, die in weiteren Untersuchungen unter genauer definierten Bedingungen vermessen wurden. Dabei wurde das Augenmerk auf eine möglichst hohe Stromdichte, sowie auf biofilmbildende Eigenschaften gelegt. Als besonders geeignet haben sich dabei die Substrate Acetat, Mannitol, Glycerin und Zitronensäure herausgestellt. Durch die Beobachtung, dass auch die Ölsäure zu einem gewissen Grad abbaubar zu sein scheint und sich viele planktonische Zellen bilden, wurde auch diese ausgewählt.

### **4.2 Untersuchung von Monosubstraten und deren Einfluss auf die Biofilmbildung sowie deren elektrochemische Aktivität**

Ziel dieser Versuchsreihe war es, die Abhängigkeit der Zusammensetzung des Biofilms vom verwendeten Substrat zu untersuchen und etwaige Zusammenhänge zwischen den maximalen Stromdichten und dominierenden Spezies im Biofilm darzustellen. Während der Zyklen wurden elektrochemische Charakterisierungen vorgenommen und Parameter wie  $j_{max}$ ,  $CE$  und  $E^f$  bestimmt. Als Inokulum dienten die bereits in Kapitel 3.1 erwähnten Stockings des primären Abwassers, wodurch jeweils identische Inokuli genutzt wurden.

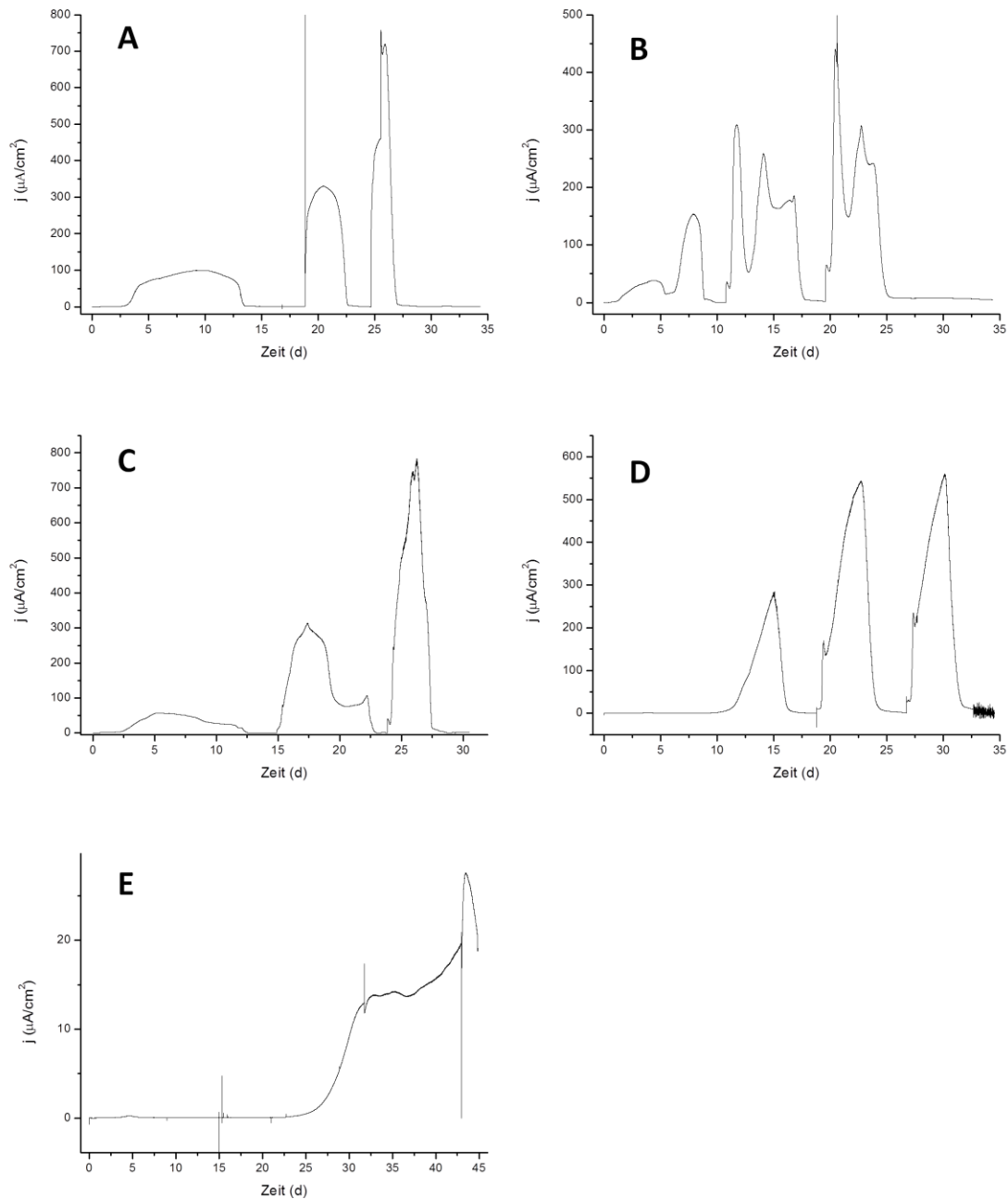
#### **4.2.1 Elektrochemische Untersuchungen**

Die in Kapitel 4.1 ausgewählten Substrate (vgl. Tab. 4.1) wurden nun in insgesamt drei Wachstumszyklen vermessen, um einen elektrochemisch aktiven Biofilm auf den Arbeitselektroden auszubilden. Dazu wurden die Zellen bei jedem Wechsel des Mediums mit dem unter Kapitel 3.1 vorbereiteten primären Abwasser neu inokuliert, um dafür zu sorgen, dass zu jeder Zeit eine ausreichende Anzahl an Mikroorganismen in den Zellen vorhanden ist.

Eine Auswahl an Chronoamperogrammen der verschiedenen Substrate findet sich in Abbildung 4.3.



## 4. Ergebnisse und Auswertung



**Abbildung 4.3:** Ausgewählte Chronoamperogramme. Substratkonzentration: 10 mM, angelegtes Potential 0.2 V (vs. Ag/AgCl). Die Temperatur betrug 35 °C. Zu sehen sind die Daten für Acetat (**A**), Glycerin (**B**), Mannitol (**C**), Zitronensäure (**D**) und Ölsäure (**E**). Als Inokulum wurden Stockings vom primärem Abwasser verwendet.

Bei allen Versuchen – außer bei der Ölsäure - stiegen die Maximalstromdichten im Vergleich zu den Vormessungen (vgl. Tab. 4.1 vs. 4.2). Bei Acetat (Abb. 4.3 **A**) konnte die Stromdichten fast verdoppelt werden. Die CEs lagen weiterhin im selben Be-

#### 4. Ergebnisse und Auswertung

reich wie in den Versuchen aus Kapitel 4.1 (vgl. Tab. 4.1). Das Replikat erreichte etwa nur ein Zehntel der Stromdichte und auch die *CEs* waren hier deutlich geringer.

Glycerin (Abb. 4.3 **B**) zeigte ebenfalls eine Erhöhung der Maximalstromdichte um ca. 30 %. Auch die *CEs* konnten gegenüber den Vorversuchen um ca. 45 % gesteigert werden. Wie auch bei Acetat, ging aus dem Replikat eine nicht so hohe Leistung hervor.

Die höchste Stromdichte konnte mit Mannitol erreicht werden (Abb. 4.3 **C**). Diese betrug hier  $783.7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . Interessant ist dabei, dass obwohl die Stromdichte so rapide steigt, die *CE* im Vergleich zu den Vorversuchen annähernd gleich geblieben ist. Auch hier konnte das Replikat nicht die gleiche Leistung erzielen. Wie bereits in Kapitel 4.1 erwähnt, konnten *Catal et al.* mit Mannitol als Substrat Stromdichten von ca.  $580 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  bei  $32 \text{ }^\circ\text{C}$  generieren <sup>[53]</sup>. Die hier erreichten Maximalstromdichten liegen damit um ca. 26 % höher.

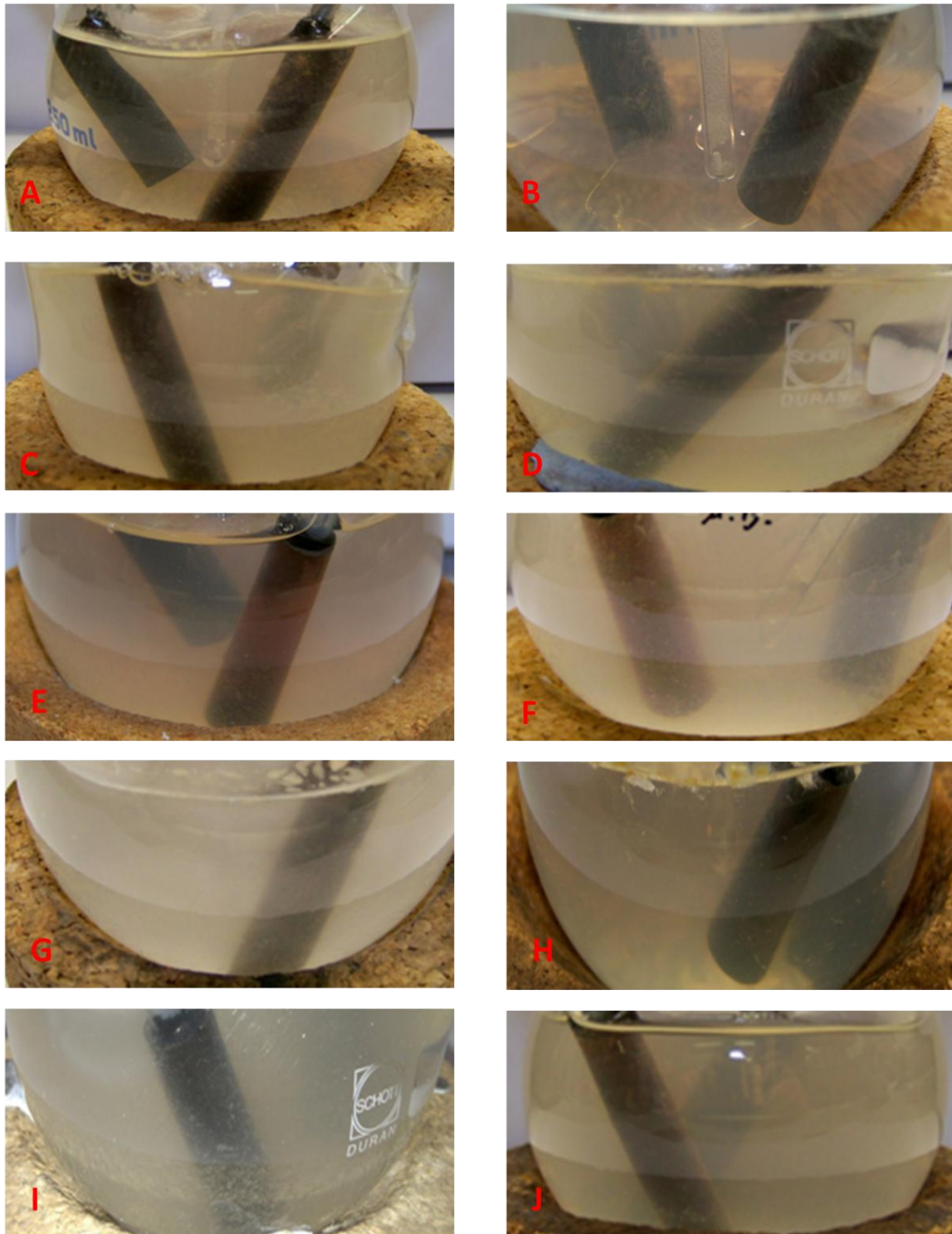
Wie auch in den Vormessungen zeigte die Zitronensäure (Abb. 4.3 **D**) eine vergleichbar gute Leistung und reiht sich damit zwischen Acetat und Mannitol ein. Das Replikat konnte zwar nicht ganz die Leistungen liefern, zeigte jedoch auch gute Werte.

Alleine die Ölsäure (Abb. 4.3 **E**) konnte keine guten Ergebnisse liefern. Beide Replikate zeigten jeweils nur geringe Maximalstromdichten von 4.5 bzw.  $27.6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . Da hier aus zeitlichen Gründen jeweils nur ein Zyklus vermessen werden konnte und dieser nicht vollständig ist (sehr lange lag-Phase von ca. 25 Tagen), konnten an dieser Stelle keine repräsentativen *CEs* berechnet werden.

Generell kann gesagt werden, dass alleine Acetat bei hohen Stromdichten ebenfalls hohe Coulombsche Effizienzen liefert. Während die maximalen *CEs* bei den anderen Substraten lediglich zwischen 40-60 % lagen, konnte mit Acetat eine *CE* von über 80 % erreicht werden.

In Abbildung 4.4 sind die angezogenen Biofilme zum Vergleich gegenübergestellt. Wie aus den Abbildungen zu entnehmen ist, unterscheiden sich die optischen Dichten der Medien untereinander relativ stark. Diese Beobachtung wird in Kapitel 4.2.2 vertiefend diskutiert und mit den Stromdichten in Zusammenhang gesetzt.

#### 4. Ergebnisse und Auswertung



**Abbildung 4.4:** Bilder der anodischen Biofilme nach drei Zyklen, Acetat (A-B), Mannitol (C-D), Zitronensäure (E-F), Ölsäure (G-H), Glycerin (I-J), jeweils beide Replikate.

Eine Übersicht der gesammelten elektrochemischen Parameter der verwendeten Monosubstrate findet sich in Tabelle 4.2.

#### 4. Ergebnisse und Auswertung

**Tabelle 4.2: Übersicht über die ermittelten elektrochemischen Parameter (Durchschnittswerte). Die Zahlen hinter den Substraten geben die (fort)laufenden Nummern (vgl. Kap. 4.1) an. Hierbei steht die Nummer „4“ für ein biologisch unabhängiges Replikat.**

| Versuch         | Maximalstromdichte $j_{\max, \emptyset}$<br>[ $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ] | $\text{CE}_{\emptyset}$ [%] | n<br>( $j_{\max}$ ) | n<br>(CE) | $E^f$ [V] |
|-----------------|---|-----------------------------|---------------------|-----------|-----------|
| Acetat 3        | 751.2   | $83.93 \pm 0.83$            | 1                   | 2         | -0.298    |
| Acetat 4        | $72.7 \pm 11.7$   | $20.11 \pm 5.55$            | 3                   | 3         | -0.321    |
| Glycerin 3      | $12.6 \pm 3.9$  | $0.93 \pm 0.06$             | 2                   | 2         | -0.334    |
| Glycerin 4      | $374.5 \pm 92.9$  | $56.87 \pm 3.93$            | 2                   | 2         | -0.334    |
| Zitronensäure 3 | $551.9 \pm 11.2$  | $57.24 \pm 2.16$            | 2                   | 2         | -0.336    |
| Zitronensäure 4 | $691.4 \pm 108.9$   | $72.72 \pm 6.93$            | 2                   | 2         | -0.329    |
| Mannitol 3      | 783.7   | $41.29 \pm 0.00$            | 1                   | 1         | -0.352    |
| Mannitol 4      | $73.4 \pm 14.6$   | $6.90 \pm 0.53$             | 2                   | 2         | -0.344    |
| Ölsäure 3       | 4.5   | /                           | 1                   | /         | /         |
| Ölsäure 4       | 27.58   | /                           | 1                   | /         | -0.293    |

Wie in Tabelle 4.2 zu sehen ist, sind die maximal erreichten Stromdichten der einzelnen Substrate im erwarteten Bereich. *Patil et al.* konnten beispielsweise die Temperaturabhängigkeit der Stromdichten in Abhängigkeit der Temperatur, bei der ein Biofilm mit Acetat als Substrat und primärem Abwasser als Inokulum angezogen wurde, darlegen <sup>[54]</sup>. Daraus geht hervor, dass ein Biofilm, der bei 35 °C angezogen wurde, eine maximale Stromdichte von ca. 800  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  liefert. Acetat 3 beispielsweise lag damit genau in dieser Größenordnung. Auch die Biofilme, die bei 30 °C angezogen wurden, zeigten Stromdichten in der erwarteten Größenordnung.

Auffällig ist die Streuung der Messergebnisse der einzelnen Replikate untereinander. Im Vergleich der Messungen Acetat 3 und Acetat 4 beispielsweise betrug der Wert der maximalen Stromdichte von Acetat 4 etwa ein Zehntel von Acetat 3, obwohl gleiche Bedingungen vorlagen (Temperatur, Potential, Substratkonzentration). Bei Glycerin und Mannitol war dies ebenfalls der Fall. Lediglich die Messungen mit Zitronensäure als Substrat zeigten geringere Abweichungen.

Gründe dafür könnten die folgenden sein: Trotz des aliquotierens des primären Abwassers kann es in den einzelnen Gefäßen zu einer unterschiedlichen mikrobiellen Zusammensetzung gekommen sein. Des Weiteren können auch innerhalb einer Spezies diverse Unterschiede auftreten (Stoffwechsel, Robustheit), wie durch *Carlquist et al.* gezeigt werden konnte <sup>[62]</sup>. Dadurch kann die biologische Varianz in

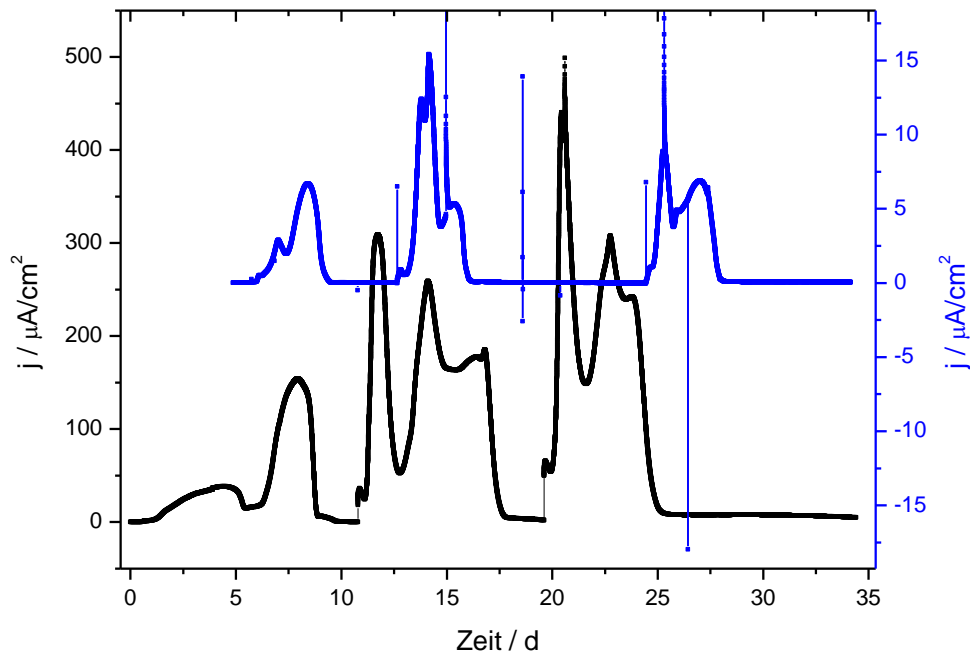
#### 4. Ergebnisse und Auswertung

den späteren Messzellen untereinander stark variieren und unter gleichen Bedingungen unterschiedliche dominierende Spezies hervorbringen. Diese müssen jedoch nicht unbedingt elektrochemisch aktiv sein, was dazu führt, dass die gemessenen Ströme sinken. Gerade bei der geringen Anzahl von nur drei Zyklen, wie es bei diesen Experimenten der Fall war, kann sich dieser Effekt negativ auswirken.

Durch eine Erhöhung der Zyklenanzahl (etwa 5-7) könnte dieser Fehler relativiert werden. Der Einfluss der mikrobiellen Zusammensetzung im verwendeten Inokulum konnte schon durch *Patil et al.* gezeigt werden <sup>[35]</sup>. Die Ergebnisse lieferten für zwei Inokuli aus derselben Quelle (primäres Abwasser der Kläranlage Steinhof, Braunschweig) eine abweichende bakterielle Mischkultur. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass *Geobacter spec.* in den Biofilmen, die eine hohe Leistung erzielt haben, die dominierenden Spezies waren. Diese Beobachtung wurde durch die nachfolgenden mikrobiellen Untersuchungen der hier gezogenen Biofilme bestätigt (siehe Kap. 4.2.2).

Weiterhin ist in den Messungen auffällig, dass die Chronoamperogramme eines Substrats und seines Replikats große Ähnlichkeiten aufweisen, auch wenn die Stromdichten sehr unterschiedlich waren. Dies soll am Beispiel von Glycerin erläutert werden (Abb. 4.5).

#### 4. Ergebnisse und Auswertung



**Abbildung 4.5:** Zum Vergleich übereinander gelegte Chronoamperogramme der Versuche Glycerin 3 (blau) und Glycerin 4 (schwarz). Die Temperatur betrug in beiden Fällen 35 °C, das angelegte Potential betrug 0.2 V (vs. Ag/AgCl), Substratkonzentration: 10 mM Glycerin.

Wie in den Kurven zu erkennen, folgen auf den ersten Peak eines Zyklus jeweils zwei weitere kleine Peaks. Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass das Glycerin schrittweise in mehreren Zwischenstufen abgebaut wurde. Die beiden nachfolgenden Peaks könnten somit zu Intermediaten zugeordnet werden, die im Anschluss abgebaut würden. Da die beiden Kurven einen sehr ähnlichen Verlauf zeigen, kann davon ausgegangen werden, dass in den Messzellen annähernd die gleichen Vorgänge stattfanden. Jedoch scheint es, dass in der blauen Messkurve nicht alle während des Stoffwechsels der Mikroorganismen frei werdenden Elektronen auf die Elektrode übertragen wurden, sondern diese eventuell anderweitig genutzt wurden und somit verloren gingen (niedrige  $CEs$  während der gesamten Messdauer). Dies könnte eventuell daran liegen, dass sich in der Zelle mit der niedrigeren Stromdichte mehr planktonische Zellen ausgebildet haben, die nicht am ET zur Elektrode beteiligt sind (vgl. Abb. 4.4 I/J). Ähnliche Muster waren auch in den Messkurven der anderen Substrate zu erkennen, sodass der Eindruck entstand, jedes Substrat hätte einen eigenen charakteristischen „Fingerprint“. Eine genauere Analytik mittels HPLC während

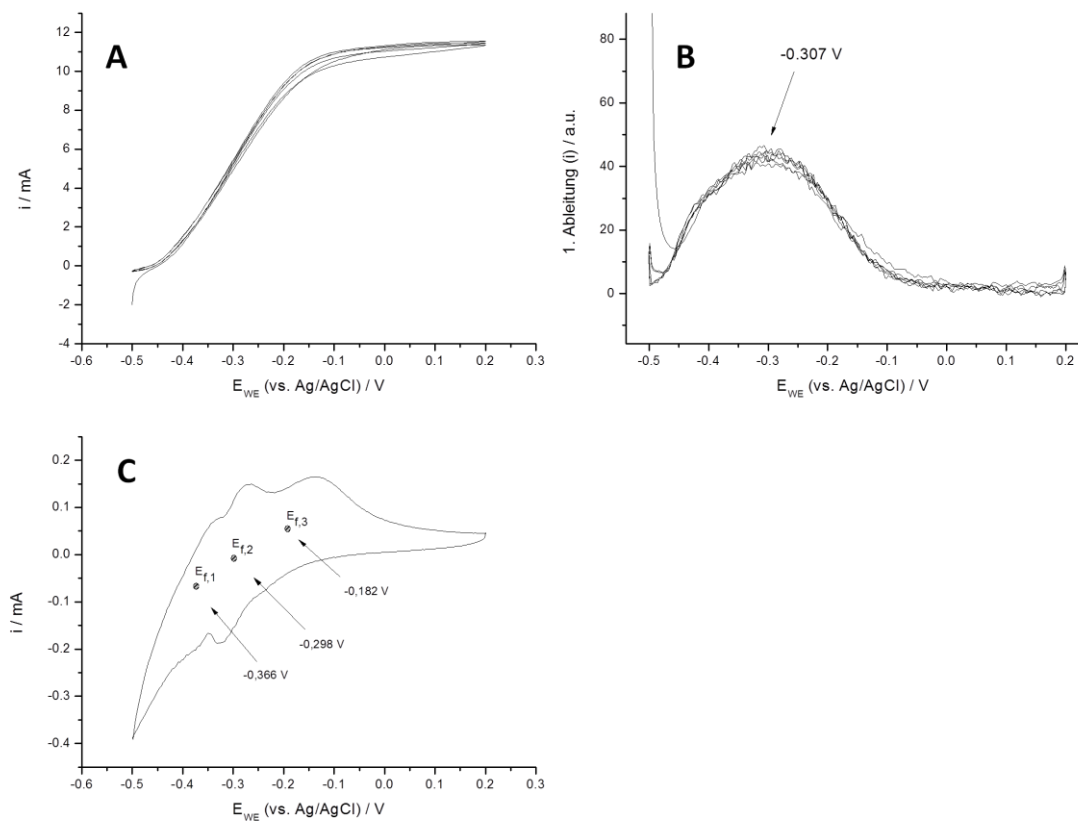
#### 4. Ergebnisse und Auswertung

definierter Zeitpunkte der Messung wäre in Folgearbeiten denkbar, um eventuelle Zwischenprodukte nachzuweisen und die hier aufgestellte These zu stützen oder zu falsifizieren.

Weiterhin ist es möglich, dass in der Zelle mit den niedrigeren Stromdichten der Anteil an elektrochemisch aktiven Mikroorganismen schlichtweg geringer war. Antworten auf diese Fragen konnten durch die Sequenzanalysen geklärt werden (siehe Kap. 4.2.2).

Während der Messungen und nach jedem Zyklus wurden CVs gemessen. Aus den so erhaltenen turnover und non-turnover CVs konnten nun die Formalpotentiale für die Biofilme der einzelnen Substrate erhalten werden (vgl. Kap. 2.2.4). Dazu wurden die Formalpotentiale aus den non-turnover CVs mit Hilfe von Gleichung 2.7 bestimmt. Für jedes Substrat findet sich eine Auswahl an CVs in den Abbildungen 4.6 - 4.11.

#### 4. Ergebnisse und Auswertung



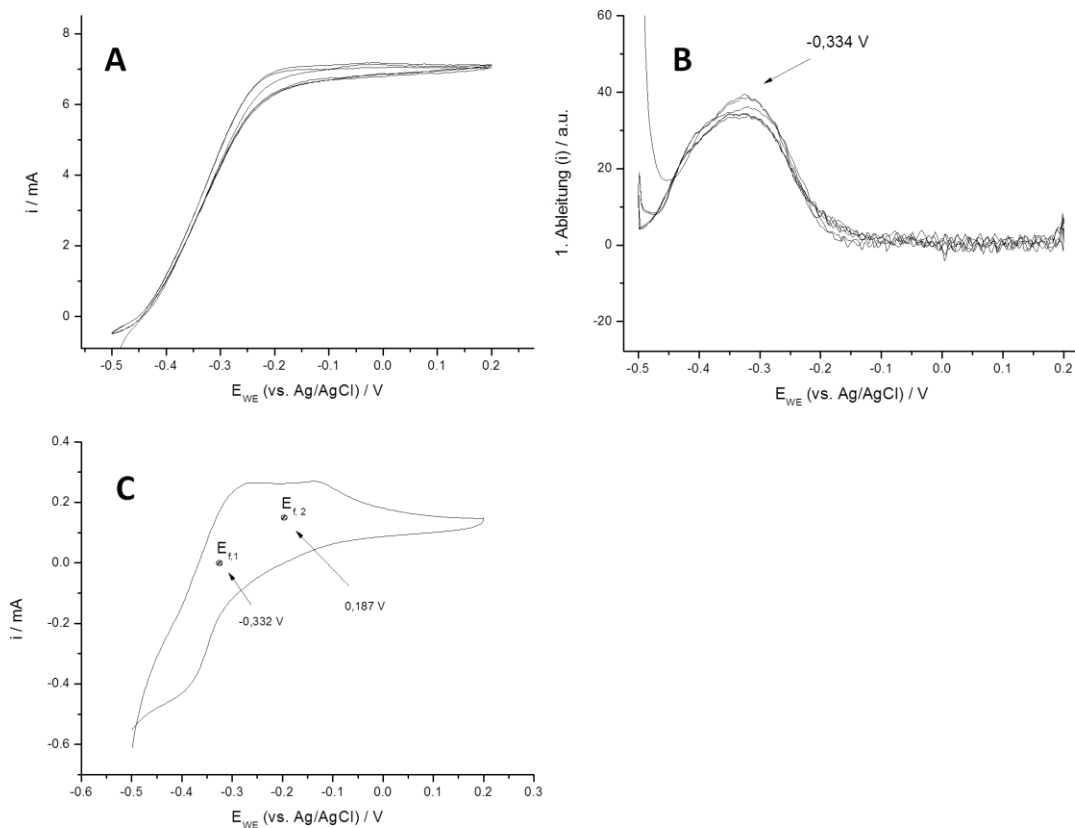
**Abbildung 4.6:** Ausgewählte CVs eines auf Acetat gezogenen Biofilms. Turnover CV (A), erste Ableitung von A (B), non-turnover CV (C). Die CVs wurden während des dritten Zyklus aufgenommen, die scan-rate betrug 1 mV/s, Potentialfenster: -0.5 – 0.2 V (vs. Ag/AgCl).

Wie aus dem turnover CV zu erkennen ist, zeigte der Biofilm (Acetat) eine gute bioelektrokatalytische Aktivität (4.6 A). Aus den turnover CVs lässt sich aus der ersten Ableitungen ein durchschnittliches Formalpotential von -0.309 V ermitteln, welches Elektronentransferspezies zugeordnet werden kann (4.6 B, andere Daten nicht gezeigt). Weiterhin lassen sich im non-turnover CV (4.6 C) insgesamt drei Redox-Zentren zuordnen ( $E_{f,1} - E_{f,3}$ ), die bei -0.366 V, -0.298 V und bei -0.182 V liegen. Da der Biofilm unter turnover Bedingungen katalytisch aktiv ist und das dort ermittelte Formalpotential in dem Bereich von  $E_{f,2}$  liegt, kann daraus geschlossen werden, dass  $E_{f,2}$  aktiv am ET teilnimmt,  $E_{f,1}$  und  $E_{f,3}$  zwar auch dem Biofilm zugeordnet werden können, jedoch nicht zum ET beitragen.



#### 4. Ergebnisse und Auswertung

Die auf Basis von Glycerin gezogenen Biofilme zeigten ebenfalls eine gute bioelektrokatalytische Aktivität (Abbildung 4.7).

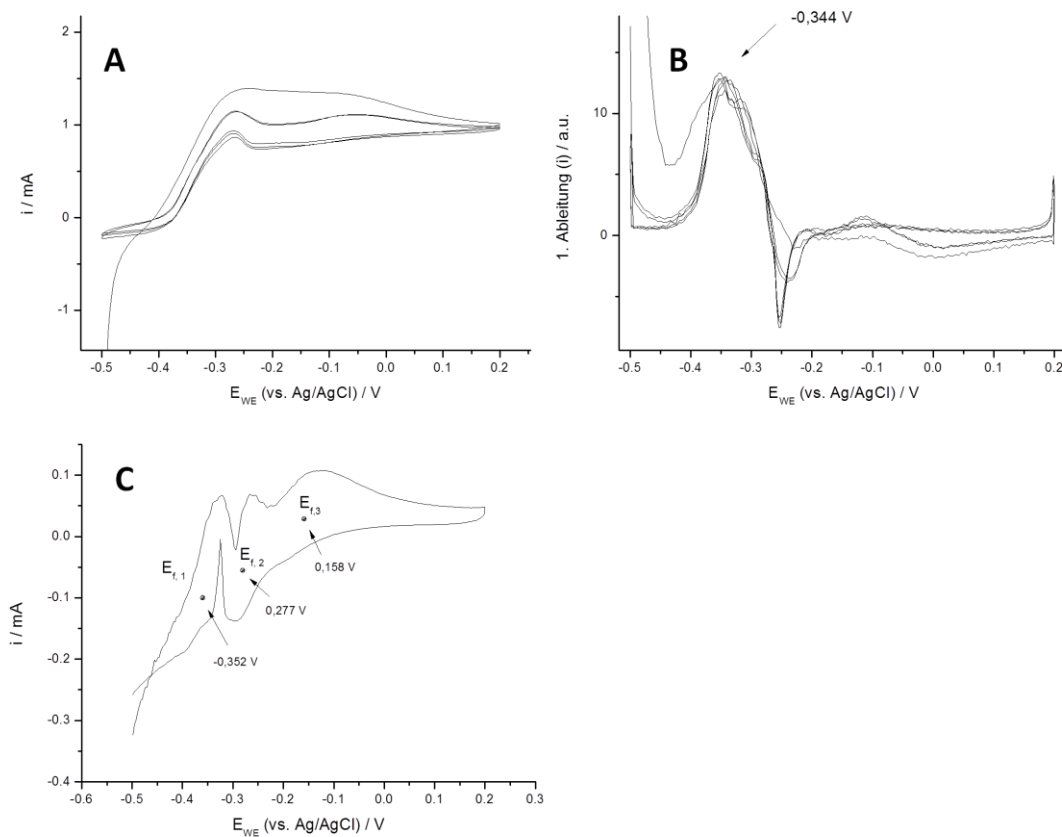


**Abbildung 4.7:** Ausgewählte CVs eines auf Glycerin gezogenen Biofilms. Turnover CV (A), erste Ableitung von A (B), non-turnover CV (C). Die CVs wurden während des dritten Zyklus aufgenommen, die scan-rate betrug  $1 \text{ mV/s}$ , Potentialfenster:  $-0,5 - 0,2 \text{ V}$  (vs. Ag/AgCl).

Auch hier zeigt das turnover CV die typische S-Struktur. Durch bilden der ersten Ableitung kann das durchschnittliche Formalpotential zu  $-0,334 \text{ V}$  ermittelt werden. Aus den non-turnover CVs ergeben sich zwei Redox-Zentren bei  $-0,332 \text{ V}$  ( $E_{\text{f},1}$ ) und  $0,187 \text{ V}$  ( $E_{\text{f},2}$ ). Daraus ergibt sich, dass  $E_{\text{f},2}$  eindeutig am ET beteiligt ist.

#### 4. Ergebnisse und Auswertung

Die Ergebnisse eines auf Mannitol gezogenen Biofilms sind in Abbildung 4.8 dargestellt.

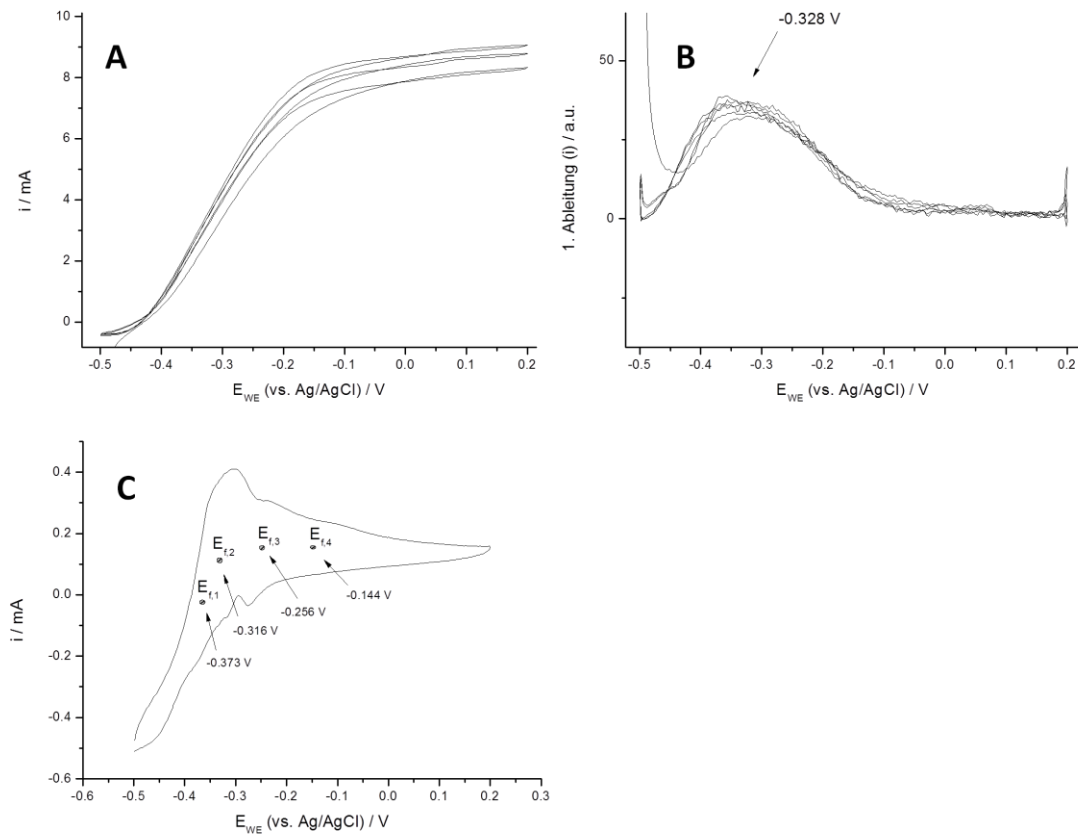


**Abbildung 4.8:** Ausgewählte CVs eines auf Mannitol gezogenen Biofilms. Turnover CV (A), erste Ableitung von A (B), non-turnover CV (C). Die CVs wurden während des dritten Zyklus aufgenommen, die scan-rate betrug 1 mV/s, Potentialfenster: -0.5 – 0.2 V (vs. Ag/AgCl).

Das CV in Abbildung 4.8 A entspricht nicht eindeutig turnover-Bedingungen, sondern wurde aufgezeichnet, als die Aktivität des Biofilms und somit auch die Stromdichte bereits etwas abgenommen hat. Dennoch lässt sich aus der ersten Ableitung ein durchschnittliches Formalpotential von -0.348 V ermitteln. Dieses stimmt annähernd mit dem Formalpotential unter  $E_{f,1}$  in Abbildung 4.8 C überein (-0.352 V).

#### 4. Ergebnisse und Auswertung

Die Ergebnisse eines auf Zitronensäure gezogenen Biofilms sind in Abbildung 4.9 dargestellt.

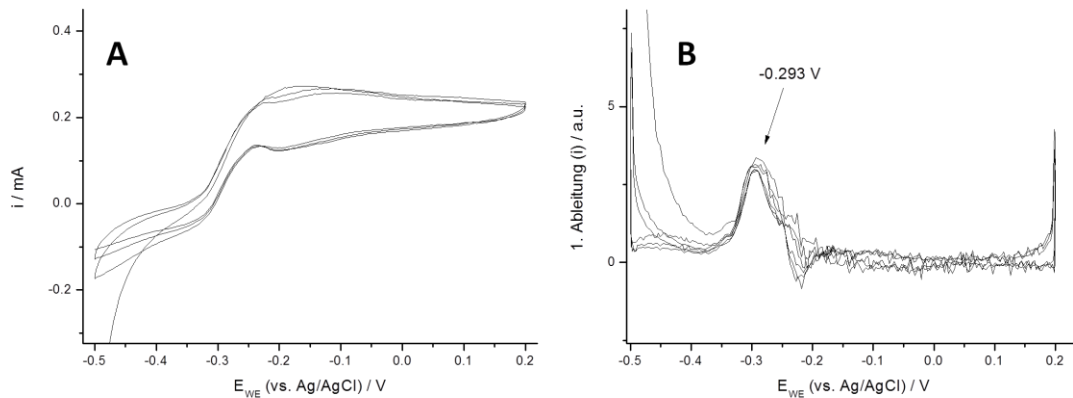


**Abbildung 4.9:** Ausgewählte CVs eines auf Zitronensäure gezogenen Biofilms. Turnover CV (**A**), erste Ableitung von A (**B**), non-turnover CV (**C**). Die CVs wurden während der dritten Zyklen aufgenommen, die scan-rate betrug 1 mV/s, Potentialfenster: -0.5 – 0.2 V (vs. Ag/AgCl).

Aus den Ergebnissen lässt sich das durchschnittliche Formalpotential aus dem turnover CV zu -0.333V ermitteln. Dieses Ergebnis deckt sich am besten mit dem Formalpotential von -0.316 V, welches  $E^{f,2}$  in Abbildung 4.9 **C** zugeordnet werden kann.

#### 4. Ergebnisse und Auswertung

Lediglich für die Ölsäure konnte kein non-turnover CV gemessen werden, da sich der Zyklus als lang andauernd erwies und aus der Messkurve kein Maximum ersichtlich war. Das gemessene turnover CV und die erste Ableitung sind in Abbildung 4.10 dargestellt.



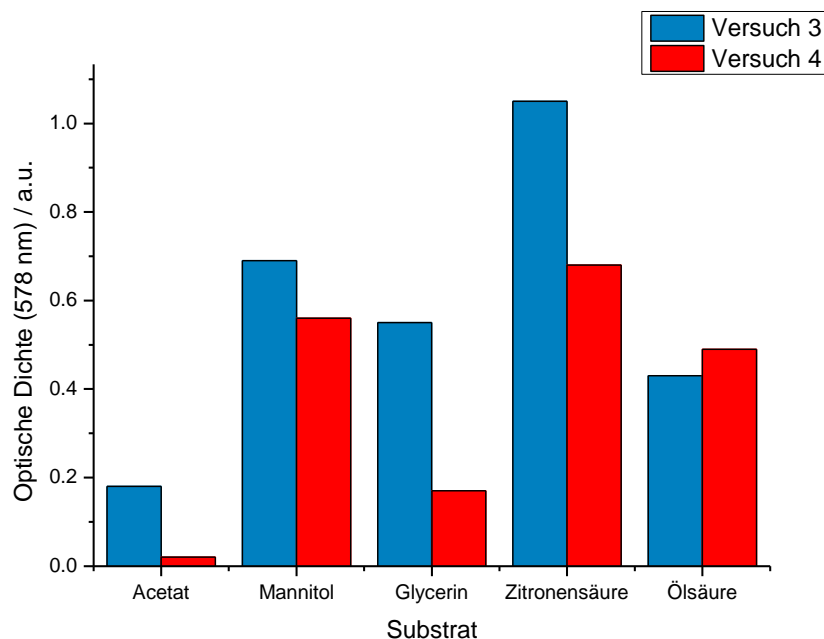
**Abbildung 4.10:** Ausgewähltes turnover CV eines auf Ölsäure gezogenen Biofilms (A), sowie die erste Ableitung von A (B). Das CV wurde während des ersten Zyklus aufgenommen, die scan-rate betrug 1 mV/s, Potentialfenster: -0.5 – 0.2 V (vs. Ag/AgCl).

Wie aus Abbildung 4.10 zu erkennen ist, fand unter Verwendung dieses Substrates zwar Bioelektrokatalyse statt, die Aktivität scheint jedoch geringer als bei den anderen untersuchten Substraten. Da die Ölsäure sehr langkettig ist ( $C_{18}$ ), dauerten die einzelnen Zyklen entsprechend länger. Im Rahmen dieser Arbeit konnte kein kompletter Zyklus vermessen werden. Aus der ersten Ableitung des turnover CVs lässt sich das Formalpotential zu -0.293 V ermitteln. Damit liegt es genau im Bereich eines auf Acetat basierten Biofilms. Da bei der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren Acetat gebildet wird (vgl. Kap. 2.1.2.3), lässt sich daraus schließen, dass die dominierende Spezies in beiden Fällen die gleiche sein könnte.

## 4. Ergebnisse und Auswertung

### 4.2.2 Biologische Untersuchungen

Zusätzlich zur Analyse von elektrochemischen Parametern wurden biologische Untersuchungen durchgeführt. Darunter befanden sich die Bestimmung der optischen Dichte der Medien zum Zeitpunkt der „Biofilm-Ernte“, sowie Untersuchungen, die die Zusammensetzung der Biofilme betrafen.



**Abbildung 4.11:** Darstellung der optischen Dichten der einzelnen Substrate bei 578 nm. Die Messungen wurden direkt nach der Ernte der Biofilme vorgenommen. Nomenklatur siehe Tabelle 4.2.

Aus Abbildung 4.11 geht hervor, dass bei Zitronensäure als Substrat die meisten planktonischen Zellen gebildet wurden, während Acetat die geringste optische Dichte und somit die wenigsten planktonischen Zellen aufwies. Glycerin, Mannitol und Ölsäure waren auf einem vergleichbaren Level. Bei Glycerin, Acetat und Zitronensäure ist auffällig, dass die Replikate untereinander ebenfalls stark variieren. Generell ließ sich anhand dieser Daten kein exakter Trend ausmachen und auch der Quotient aus optischer Dichte und Maximalstromdichte zeigte keine potentielle Korrelation. Bei Acetat beispielsweise war die Leistung ( $j_{\max}$ , CE) höher, je weniger planktonische Zellen vorhanden waren. Bei Zitronensäure war es jedoch genau umgekehrt. Denkbar wäre, dass durch die Verwendung von beispielsweise Acetat und anderer Sub-

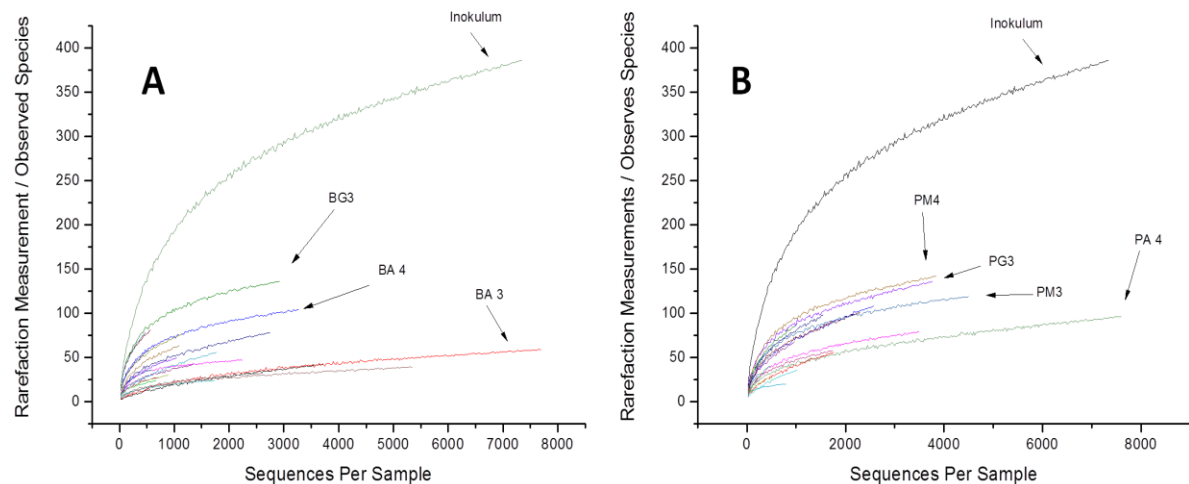
#### 4. Ergebnisse und Auswertung

strate, die Acetyl-CoA als Abbauprodukte liefern eher Mikroorganismen wuchsen, die weniger planktonische Zellen bilden und daher mehr Zellen in Form eines Biofilms auf der Elektrode vorlagen und ihre Elektronen eher über den **DET** abgeben. Bei Zitronensäure hingegen würden eher planktonische Zellen gebildet werden, die ihre Elektronen über einen anderen Elektronentransfermechanismus auf die Elektrode abgeben (**MET**). Generell wird jedoch der DET nicht zwangsläufig als effektivster Elektronentransfer angesehen <sup>[23]</sup>. Der DET liefert zwar höhere *CEs*, jedoch ist der Strom hier niedriger. Somit müssten die Zellen mit der geringeren optischen Dichte (und der daraus resultierenden geringeren planktonischen Zellzahl) auch geringere Stromdichten liefern. Weiterhin konnten *Venkata Mohan et al.* zeigen, dass die Leistung einer MFC von der Dicke des die Anode umgebenden Biofilms (anaerobe Mischkonsortien) abhängt. So erzielten teilweise entwickelte Biofilme geringere Leistungen, als voll entwickelte (Einkammer MFC mit Luft-Kathode, mikrobielle Mischkonsortien) <sup>[55]</sup>. Um genauere Aussagen treffen zu können, müsste weiterführend ein Vergleich zwischen der Masse der Biofilme auf den Anoden und der planktonischen Zellen erfolgen. Dies konnte auf Grund der Art der Probenentnahme jedoch nicht realisiert werden.

Desweiteren wurden Sequenzierungen der gezogenen Biofilme, der planktonischen Zellen und des verwendeten Inokulums durchgeführt. Die Nomenklatur der Proben ist dabei wie folgt zu lesen: *B* und *P* stehen für „Biofilm“ bzw. „planktonisch“. Die Buchstaben dahinter für das jeweils verwendete Substrat: *A* (Acetat), *G* (Glycerin), *Z* (Zitronensäure), *M* (Mannitol), *Ö* (Ölsäure). Die Nummern geben die jeweilige laufende Versuchsnummer an. Die Bezeichnung „BG3“ steht also für einen Biofilm, der mit Glycerin angezogen wurde und die laufende Nummer 3 erhält.

Ein Maß auf die Diversität in den verschiedenen Proben geben sogenannte Rarefaction-Kurven (Abbildung 4.12).

#### 4. Ergebnisse und Auswertung



**Abbildung 4.12:** Rarefaction-Kurven der Biofilmprouben (A) sowie der planktonischen Zellen (B). Weiterhin ist das Inokulum dargestellt. Es wurden sowohl DNA-, als auch RNA-Proben vermessen.

Hierbei werden pro Probe mehrere Sequenzierungen durchlaufen. Mit jeder durchlaufenen Sequenzierung steigt dabei die Zahl der detektierten Spezies. Nach einer bestimmten Anzahl an Sequenzen steigt die Kurve nur noch leicht an und strebt gegen einen Sättigungswert, d.h. es wird (statistisch) immer unwahrscheinlicher neue Spezies zu detektieren. Wie in Abbildung 4.12 zu erkennen ist, zeigte das Inokulum die höchste (rein qualitative) Biodiversität bei gleichzeitig der höchsten Zahl an Sequenzierungen. Die Biofilme und die planktonischen Zellen zeigten dagegen eine geringere Biodiversität. Daraus lässt sich schließen, dass sowohl in den Biofilmen, als auch in den planktonischen Zellen Mikroorganismen selektiv elektrochemisch angereichert wurden. Dies geht auch mit den Ergebnissen die Patil et al. erzielt haben einher <sup>[35]</sup>. Besonders der Biofilm BG3 zeigte eine hohe Biodiversität. Der Vergleich zwischen den beiden auf Acetat gezogenen Biofilmen zeigt deutliche Unterschiede in der Diversität. Diese Beobachtungen konnten in den folgenden Untersuchungen der mikrobiellen Community bestätigt werden. Im Vergleich der planktonischen Zellen zeichneten sich vor allem bei Verwendung von Glycerin und Mannitol als Elektronendonoren, die höchsten Diversitäten ab. Dies deckt sich ebenfalls mit den Ergebnissen, die durch die Messung der optischen Dichte erzielt wurden, wobei die Zahl der planktonischen Zellen bei der Glycerin und Mannitol beide recht hoch waren. Die Zitronensäure lieferte die höchste Anzahl an planktonischen Zellen, jedoch ist hier die Diversität geringer und liegt auf ähnlichem Niveau wie bei Acetat 4. Zu

#### 4. Ergebnisse und Auswertung

beachten ist hier jedoch, dass nur 1750 Sequenzierungen durchlaufen wurden und noch kein Maximum der Kurve erreicht wurde.

Zur Untersuchung der Biofilme sowie der planktonische Zellen wurden weiterhin Sequenzierungen auf DNA- und RNA-Ebene durchgeführt (siehe auch Kap. 3.3.2). Außerdem wurde das verwendete Inokulum ebenfalls auf die mikrobielle Zusammensetzung hin untersucht. Die DNA- und RNA-Untersuchungen des Inokulums zeigten eine hohe mikrobielle Diversität, während Biofilme und planktonischen Zellen jeweils hauptsächlich von vier Abteilungen dominiert werden (Abbildung 4.13)



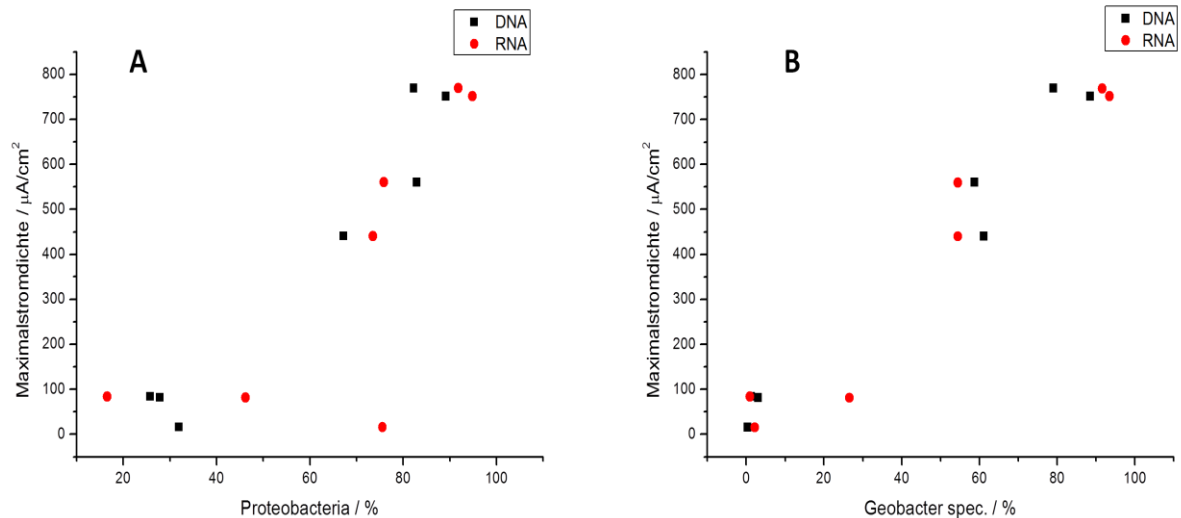


#### 4. Ergebnisse und Auswertung

Aus Abbildung 4.13 **A** geht hervor, dass die vier dominierenden Abteilungen im Inokulum *Proteobacterien* (rosa), *Fusobacterien* (hell-orange), *Firmicutes* (hellblau) und *bacteroidete* Bakterien (grün) sind. Die *Proteobacterien* bilden von allen Proben den Hauptteil mit 31.2 %, gefolgt von den *Bacteroideten* (24.2 %), den *Fusobacterien* (23.5 %) und den *Firmicutes* (20.1 %). Auffällig ist, dass bei genauerer Spezifizierung der vorhandenen Abteilungen die Familie der *Geobacteraceae* einen Großteil der Biofilme ausmacht. In der Probe „BA3-DNA“ beispielsweise beträgt der Anteil an *Geobacter* (flieder) 88.5 % (Abbildung 4.13 **B**). Im vermessenen reinen Inokulum dagegen konnte kein *Geobacter* nachgewiesen werden (vgl. auch Patil et al. <sup>[35]</sup>). Werden die Biofilmanalysen genauer betrachtet, so fällt auf, dass sich *Geobacter spec.* in allen Proben angereichert haben. In den Mannitol-Proben ist dagegen die Familie der *Clostridiaceae* dominierend. Auch in den planktonischen Zellen haben sich *Geobacter spec.* angereichert, jedoch in deutlich geringerem Maße. Dies scheint jedoch den vorher aufgestellten Vermutungen zu widersprechen, dass *Geobacteraceae* hauptsächlich DET betreiben und daher keine planktonischen Zellen ausbilden. Da die Zellzahl jedoch sehr gering ist, kann davon ausgegangen werden, dass das Vorhandensein in planktonischer Form durch andere Einflüsse bedingt war (bspw. Ablösungen von den Elektroden, Absterben von Zellen).

Da dieser Organismus im Inokulum nicht nachweisbar war, deutet dies auf eine elektrochemische Anreicherung im Biofilm hin, da keine allzu spezifischen Substrate angeboten wurden. Diese Ergebnisse lassen die Vermutung aufkommen, dass entweder die *Proteobacterien* im Allgemeinen - oder aber genauer – *Geobacter spec.* für den Stromfluss durch den Biofilm verantwortlich sind. In Abbildung 4.14 sind die in den Versuchen ermittelten Maximalstromdichten über dem relativen Anteil an *Proteobacterien* und *Geobacteraceae* aufgetragen.

#### 4. Ergebnisse und Auswertung



**Abbildung 4.14:** Abhängigkeit der maximalen Stromdichte von der Proteobakterienkonzentration (A) sowie der Geobacterkonzentration (B). Es sind sowohl die Ergebnisse aus den DNA- als auch aus RNA-Proben dargestellt.

Bei den *Proteobacterien* unterscheiden sich die Ergebnisse der DNA-, und RNA-Sequenzierung nur minimal voneinander. Es ist ein linearer Zusammenhang erkennbar, der bei den DNA-Proben etwas deutlicher ausfällt. Dieser lineare Zusammenhang ist auch beim Anteil an *Geobacteraceae* zu beobachten, fällt allerdings im Vergleich deutlicher aus. Auch die Ergebnisse der DNA- und RNA-Proben liegen hier noch dichter beieinander. Dies wurde auch nach einer linearen Regression durch die besseren Determinationskoeffizienten ( $R^2$ ) bestätigt. Die Parameter der linearen Regression finden sich in Tabelle 4.3.

**Tabelle 4.3:** Parameter der linearen Regression zu Abbildung 4.14, die zu Grunde liegende Gleichung lautet  $y=a+b \cdot x$ .

|                       | Proteobacteria |         | Geobacter |         |
|-----------------------|----------------|---------|-----------|---------|
|                       | DNA            | RNA     | DNA       | RNA     |
| $R^2$                 | 0.93073        | 0.46306 | 0.96135   | 0.92911 |
| y-Achsenabschnitt (a) | -257.34        | -208.86 | 42.13     | 4.69    |
| Steigung (b)          | 11.05          | 8.77    | 8.23      | 8.24    |

#### 4. Ergebnisse und Auswertung

Durch die festgelegte Versuchsdauer von 3 Zyklen pro Substrat kann es sein, dass sich die Maximalstromdichten noch nicht gänzlich in einem Gleichgewicht befanden. Außerdem schwankten diese von Zyklus zu Zyklus immer ein wenig, was durch biologische Vorgänge in den Messzellen, aber auch durch mechanische Einflüsse bedingt sein kann (z.B. Absterben von Mikroorganismen, Ablösen von Teilen des Biofilmes von der Elektrodenoberfläche). Als Folge resultieren geringe Abweichungen in der Linearität der Regressionsgeraden. Diese Folgerungen bestätigen die Ergebnisse, die *Liu et al.* gemacht haben. Dort konnte gezeigt werden, dass die Biofilmbildung mit häuslichen Abwässern als Inokulum mit langen lag-Zeiten einher geht und sich erst nach mehreren Zyklen konstante Zustände der Maximalströme und biologischen Zusammensetzungen einstellen <sup>[61]</sup>.

Die Ergebnisse aus den Sequenzanalysen bestätigen die in Kapitel 4.2.1 aufgestellten Vermutungen, dass die unterschiedlich hohen Stromdichten mit der Anreicherung einer bestimmten elektrochemisch aktiven Spezies im Biofilm zusammenhängen. Die Biofilme, welche eine geringere elektrochemische Aktivität aufwiesen, besitzen einen geringeren prozentualen Anteil an *Geobacter spec.* als Biofilme mit einem höheren Anteil. Außschließlich die mit Mannitol gezogenen Biofilme bilden eine Ausnahme. Hier ist bei hohen Strömen nur ein geringer Anteil an *Geobacteraceae* zu finden (ca. 1.3 %). Dieser geringe Anteil lässt sich dadurch erklären, dass bspw. für *Geobacter sulfurreducens* zwar Wege einer Glykolyse nachgewiesen worden sind, jedoch fehlen im Genom bestimmte Zuckertransporter um dieses Substrat in die Zellen einzubringen <sup>[18]</sup>. Generell sind die Biofilme, die mit Mannitol angezogen wurden im Vergleich zu den einfacheren Substraten viel komplexer zusammengesetzt. Dies deckt sich auch mit der Aussage von *Kim et. al.*, dass *Geobacter* bei komplexeren Substraten eine Vielzahl an anderen Bakterien benötigt (bspw. fermentative Bakterien), die zusammen in einer Art Symbiose leben <sup>[56]</sup>. Daraus ergibt sich ein sehr artreiches Spektrum im Biofilm, welches hier auch nachgewiesen werden konnte. Sogar bei der Ölsäure als Substrat wurden hauptsächlich *Geobacter spec.* angereichert. Denkbar wäre eine Weitergabe der durch  $\beta$ -Oxidation gebildeten Acetyl-Einheiten an *Geobacter*, was die geringen *CEs* in den Messungen erklären würde. Da die gemessenen Chronoamperogramme im Gegensatz zu den für andere Substrate erhaltenen Kurven über einen längeren Zeitraum eine geringere Steigung aufwiesen, lag hier wahrscheinlich eine Limitation im Massentransport vor. Als Folge bleibt der Strom-

#### 4. Ergebnisse und Auswertung

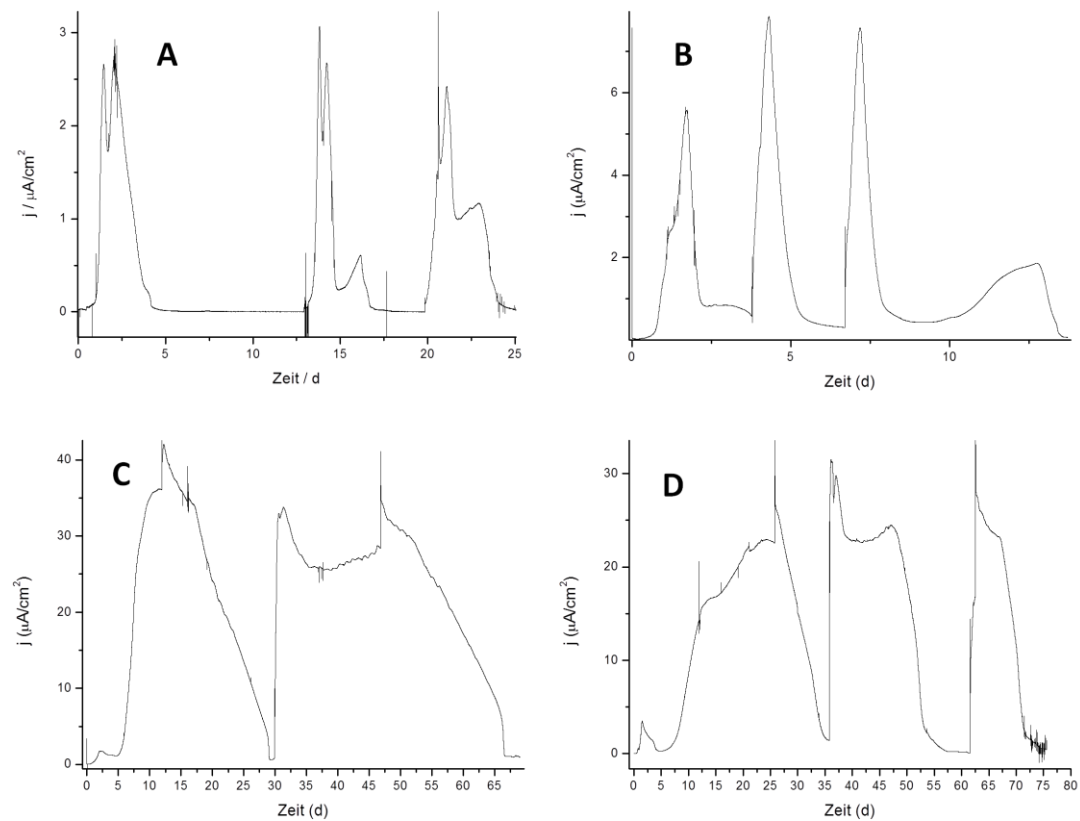
fluss annähernd konstant, da die Geschwindigkeit der Generierung von Acetyl-Einheiten ihrerseits ebenfalls durch Mikroorganismen limitiert wird.

Die Zusammensetzung der planktonischen Zellen ist bei allen Proben ebenfalls sehr komplex. Hier dominieren vor allem *Proteobacterien* und *Bacteroideten*. Der Anteil an *Geobacter spec.* beispielsweise ist bei „PA3-DNA“ mit 19.77 % relativ gering. Auch die anderen Proben weisen einen geringen Anteil an *Geobacter spec.* auf, was darauf hindeutet, dass dieser Organismus eher zur Biofilmbildung neigt, als zum Aus-senden planktonischer Zellen (s.o.).

#### 4. Ergebnisse und Auswertung

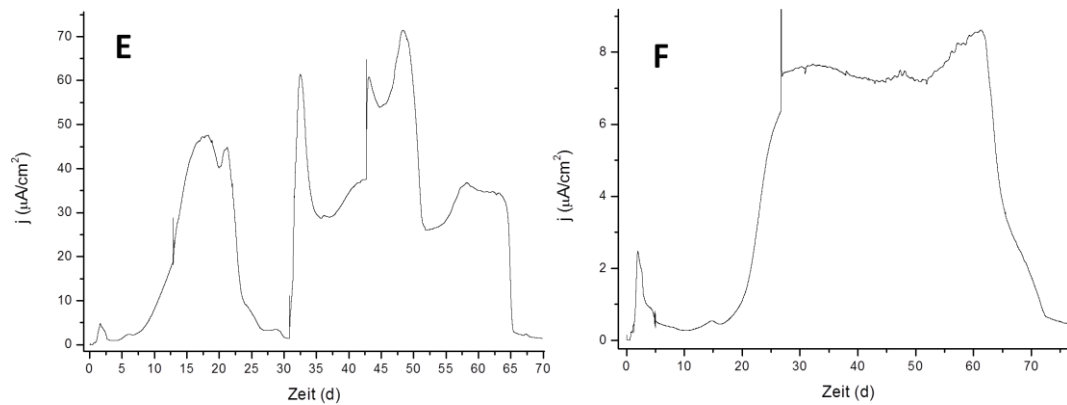
### 4.3 Untersuchungen an Mischsubstraten

In Ergänzung zu den in Kapitel 4.2 beschriebenen Monosubstraten soll an dieser Stelle die Untersuchung von Mischsubstraten erfolgen (vgl. Tab. 3.7). Abbildung 4.15 zeigt ausgewählte Chronoamperogramme der durchgeführten Versuche.



**Abbildung 4.15a:** Ausgewählte Chronoamperogramme zu den verschiedenen Substratmischungen, die Konzentration pro Substrat betrug 5 mM, Temperatur: 35 °C, angelegtes Potential: 0.2 V (vs. Ag/AgCl). Zu sehen sind die Daten für Acetat/Zitronensäure (A), Glycerin/Zitronensäure (B), Acetat/Glycerin (C) und Acetat/Mannitol (D). Als Inokulum wurde primäres Abwasser verwendet.

#### 4. Ergebnisse und Auswertung



**Abbildung 4.15b:** Ausgewählte Chronoamperogramme zu den verschiedenen Substratmischungen, die Konzentration pro Substrat betrug 5 mM, Temperatur: 35 °C, angelegtes Potential: 0.2 V (vs. Ag/AgCl). Zu sehen sind die Daten für Glycerin/Mannitol (E) und Zitronensäure/Mannitol (F). Als Inokulum wurde primäres Abwasser verwendet.

Generell waren die erreichten Maximalstromdichten in allen Versuchen auffällig gering und reichten nicht an die Ergebnisse heran, die mit den Monosubstraten erreicht wurden (vgl. Kap. 4.2). Dies kann mehrere Gründe haben. Einerseits können die verwendeten Substratmischungen dazu führen, dass die Adaption der Mikroorganismen schwieriger war. Andererseits haben sich die Einzelsubstrate durchaus als geeignet erwiesen und die ausgewählten Mischungen wurden nicht allzu komplex gewählt, um einen großen Einfluss zu haben. Jedoch deuten die im Vergleich zu den Einzelsubstraten bei den meisten Substratmischungen erhöhten lag-Zeiten auf eine schlechtere Adaption hin. Weiterhin dauerten auch die nachfolgenden Zyklen bei fast allen Versuchen deutlich länger als bei den Monosubstraten. Im Durchschnitt wurden ca. 30 Tage für einen kompletten Zyklus benötigt. Lediglich die Mischungen Acetat/Zitronensäure und Glycerin/Zitronensäure wiesen kürzere Zyklen auf. Auch eine Änderung des pH-Wertes während der Messungen konnte als Grund für die schlechteren Leistungen ausgeschlossen werden, da dieser (durch den verwendeten Puffer) immer im Bereich um pH 7 lag. Der Verbrauch der Substrate lag ebenfalls in allen Fällen unter dem Detektionslimit der HPLC, sodass dieser als vollständig angenommen wird.

Ein weiterer wichtiger Faktor kann auch sein, dass sich durch die Verwendung von Substratmischungen komplexere mikrobielle Communities ausbilden. Dies würde im

#### 4. Ergebnisse und Auswertung

Einklang mit den Ergebnissen stehen, die durch die Sequenzierungen in Kapitel 4.2 für den Elektronendonator Mannitol erzielt wurden. Dieses komplexere Substrat führte dazu, dass sich im Gegensatz zu den anderen verwendeten Monosubstraten eine ausgeprägtere Mischkultur entwickelt hat. Dies könnte hier ebenfalls der Fall sein, was dazu führen kann, dass bspw. fermentative Bakterien angereichert wurden, die die Leistung mindern.

Weiterhin könnte das verwendete Inokulum ebenfalls ein Grund für die relativ geringen Leistungen sein. Im Gegensatz zu den Einzelsubstraten wurde hier eine andere Charge des primären Abwassers verwendet. Dies wurde zwar ebenfalls von der Kläranlage „Stein Hof“ bezogen, kann sich aber in seiner mikrobiellen Zusammensetzung deutlich von dem zuvor verwendeten Inokulum unterscheiden (vgl. auch *Patil et al.* <sup>[35]</sup>). Dadurch kann es vorkommen, dass im Inokulum bereits weniger elektrochemisch aktive Mikroorganismen vorlagen und nicht angereichert werden konnten. Durch mündliche Absprache mit Mitarbeitern in der Arbeitsgruppe hatte sich herausgestellt, dass es ebenfalls zu Problemen mit der Biofilmbildung (Acetat als Substrat) aus primärem Abwasser aus derselben Charge gekommen ist.

Eine Zusammenfassung der elektrochemischen Parameter findet sich in Tabelle 4.4.



#### 4. Ergebnisse und Auswertung

**Tabelle 4.4: Übersicht über die ermittelten elektrochemischen Parameter (Durchschnittswerte). Die Zahlen hinter den Substraten geben die laufenden Nummern an. Hierbei steht die Nummer „2“ für ein biologisch unabhängiges Replikat.**

| Versuch                  | Maximalstromdichte $j_{\max, \emptyset}$ [ $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ] | $CE_{\emptyset}$ [%] | n ( $j_{\max}$ ) | n (CE) | $E^f$ [V] |
|--------------------------|--|----------------------|------------------|--------|-----------|
| Acetat/Zitronensäure 1   | $2.8 \pm 0.3$  | $0.3 \pm 0.1$        | 3                | 3      | 0.103     |
| Acetat/Zitronensäure 2   | $2.2 \pm 0.1$  | $0.3 \pm 0.1$        | 3                | 3      | 0.109     |
| Acetat/Glycerin 1        | $38.5 \pm 5$   | $46.5 \pm 14.2$      | 2                | 2      | 0.091     |
| Acetat/Glycerin 2        | 16.19  | 1.36                 | 1                | 1      | 0.069     |
| Acetat/Mannitol 1        | $28.8 \pm 2.6$   | $13.4 \pm 5.2$       | 3                | 3      | 0.099     |
| Acetat/Mannitol 2        | 13.7   | $0.8 \pm 0.2$        | 1                | 3      | 0.076     |
| Zitronensäure/Mannitol 1 | 8.55   | 10.39                | 1                | 1      | 0.146     |
| Zitronensäure/Mannitol 2 | $2.6 \pm 1$  | $0.6 \pm 0.2$        | 2                | 2      | 0.134     |
| Glycerin/Zitronensäure 1 | $7 \pm 1.2$  | $0.2 \pm 0.1$        | 3                | 3      | 0.119     |
| Glycerin/Zitronensäure 2 | $2.6 \pm 0.2$  | $0.6 \pm 0.3$        | 2                | 2      | /         |
| Glycerin/Mannitol 1      | $61.7 \pm 15.3$  | $35.7 \pm 5.6$       | 2                | 2      | 0.248     |
| Glycerin/Mannitol 2      | $59.5 \pm 16.8$  | $31.9 \pm 20.7$      | 2                | 2      | 0.270     |

Die Mischung Acetat/Zitronensäure (Abb. 4.15 **A**) lieferte sehr geringe Stromdichten bei durchschnittlich geringen  $CEs$ . Bereits nach dem ersten Zyklus stellte sich eine konstante Maximalstromdichte ein und erhöhte sich in den darauf folgenden Zyklen nicht wesentlich. Daher wurde diese Versuchsreihe nach 3 Zyklen abgebrochen. Beide Replikate zeigten ähnliche Stromdichten und vergleichbare Kurvenverläufe.

Die Substratmischung Acetat/Mannitol (Abb. 4.15 **D**) lieferte dagegen etwas höhere Stromdichten, kam allerdings ebenfalls nicht an die Leistung der Monosubstrate heran. Das Replikat zeigte geringere Maximalstromdichten und  $CEs$ .

Bei Acetat/Glycerin waren die Ergebnisse ähnlich. Die Maximalstromdichten und auch die  $CEs$  lagen etwas höher. Es wurde die höchste  $CE$  in dieser Versuchsreihe erreicht ( $46.5 \pm 14.2$  %) Das Replikat zeigte hier ebenfalls geringere Werte.

#### 4. Ergebnisse und Auswertung

Die Mischung Glycerin/Zitronensäure liefert eine vergleichbar geringe Maximalstromdichte und *CEs* wie Acetat/Zitronensäure. Hier konnte das Replikat einen geringeren Wert für die Maximalstromdichte erzielen, der Wert für die *CE* hingegen fiel höher aus.

Lediglich die Mischung Glycerin/Mannitol lieferte in dieser Testreihe relativ hohe Maximalstromdichten bei vergleichbar hohen *CEs*. Hier wurden bei beiden Replikaten ähnliche hohe Maximalstromdichten von  $59.5 \pm 16.8$  bzw.  $61.7 \pm 15.3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  erreicht.

Bei allen Versuchen konnte während der gesamten Messdauer kein ausgeprägter Biofilm erhalten werden, wie es bei den Monosubstraten der Fall war. Dies wird auch durch die erhaltenen turnover und non-turnover CVs bestätigt. Die turnover CVs zeigen nur geringe katalytische Aktivität und die non-turnover CVs zeigen kaum signifikante Redox-Zentren auf. Bei vielen der getesteten Mischungen konnten Formalpotentiale des ET um  $-0.1 \text{ V}$  ermittelt werden. Allenfalls bei der Mischung Glycerin/Manitol beginnen sich Redox-Zentren auszubilden. Hier lässt sich das durchschnittliche Formalpotential zu  $-0.259 \text{ V}$  bestimmen. Um ausgeprägte Biofilme zu erhalten und die Daten zu verifizieren, müssten insgesamt mehr Zyklen durchlaufen werden, was im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht möglich war.

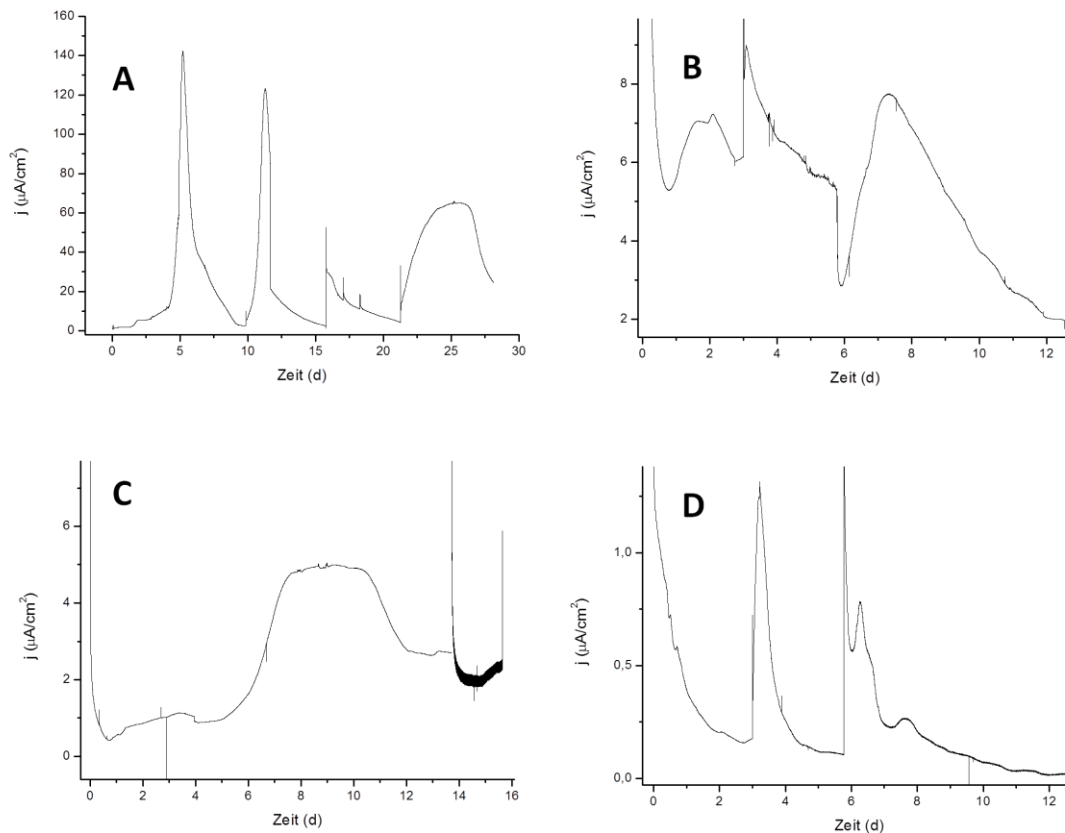
#### **4.4 Untersuchungen an realen Abwässern**

Letztendlich sollen MFCs zukünftig mit realen Abwässern betrieben werden. In diesen Untersuchungen wurden verschiedene Abwässer im Labormaßstab auf ihre Stromproduktion und Eignung zur Verwendung untersucht. Die hier erzielten Ergebnisse sollen dazu verwendet werden, um in späteren Arbeiten einen Prototyp mit einem Anodenkammervolumen von ca. 33 L Fassungsvermögen zu betreiben. Dieser Prototyp befindet sich derzeit in ersten Testläufen mit künstlichem Abwasser und wurde vom Institut für Ökologische und Nachhaltige Chemie (TU Braunschweig, Arbeitskreis Prof. Dr. U. Schröder) in Zusammenarbeit mit dem Institut für Siedlungswasserwirtschaft (TU Braunschweig, Arbeitskreis Prof. Dr. N. Dichtl) entworfen.

Zunächst wurden die in Tabelle 3.7 beschriebenen Abwässer (Zentratwasser vor Faulung, Zentratwasser nach Faulung, Gelbwasser, Ablauf Vorklärung)

#### 4. Ergebnisse und Auswertung

chronoamperometrisch vermessen. Die zugehörigen Chronoamperogramme finden sich in Abbildung 4.16.



**Abbildung 4.16:** Chronoamperogramme der untersuchten realen Abwässer. Die Temperatur betrug 35 °C, das angelegte Potential 0.2 V (vs. Ag/AgCl). Zu sehen sind die Daten für die Abwässer Ablauf Vorklärung (A), Gelbwasser (B), Zentratwasser vor Faulung (C) und Zentratwasser nach Faulung (D).

Wie aus Abbildung 4.16 hervorgeht, eignen sich die untersuchten Abwässer nur bedingt im Einsatz in einer MFC, was aber auch mit dem verwendeten Inokulum einher gehen könnte (vgl. Kap. 4.3). Eine Biofilmbildung an der Arbeitselektrode konnte nur bei dem Abwasser „Ablauf Vorklärung“ beobachtet werden. Wahrscheinlich müssten hier jedoch weitere Zyklen über einen längeren Zeitraum durchlaufen werden um einen ausgeprägten Biofilm zu erhalten. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht durchgeführt werden.

#### 4. Ergebnisse und Auswertung

Das Gelbwasser (Abb. 4.16 **B**) erreichte nur eine maximale Stromdichte von  $9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . Die beiden Zentratwässer (vor bzw. nach der Faulung) (Abb. 4.16 **C/D**) liefern ebenfalls nur geringe Stromdichten von 5 bzw.  $1.3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . Lediglich das untersuchte Abwasser aus dem Ablauf der Vorklärung (Abb. 4.16 **A**) lieferte eine relativ hohe Maximalstromdichte von  $142.2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . Hier gingen jedoch die Stromdichten nach einigen Zyklen ebenfalls zu deutlich niedrigeren Werten über. Der chemische Sauerstoffbedarf (Chemical Oxygen Demand, **COD**, Bestimmung mit Küvetten-Test LCK 014, LCK 514, Hach Lange, Deutschland) der einzelnen Abwässer sowie die während der ersten zwei Zyklen geflossenen Ladungen sind in Tabelle 4.5 dargestellt.

**Tabelle 4.5: Parameter der Untersuchung von realen Abwässern.**

| Abwasser                      | Ladung<br>Zyklus 1<br>[C] | Ladung<br>Zyklus 2<br>[C] | COD<br>[mg O <sub>2</sub> /L] | $j_{\text{max},\emptyset}$ [ $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ]<br>(n = 2) |
|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------------|---|
| Ablauf Vorklärung             | 255.92                    | 237.35                    | 592                           | $110.2 \pm 40.2$  |
| Gelbwasser                    | 49.39                     | 35.65                     | 5160                          | $8 \pm 1$   |
| Zentratwasser vor<br>Faulung  | 2.46                      | 1.53                      | 5421                          | 5 (n = 1)   |
| Zentratwasser nach<br>Faulung | 40.21                     | 5.26                      | 2106                          | $1.2 \pm 0.4$   |

Die Ermittlung der *CE* beim Abwasser „Ablauf Vorklärung“ wurde im letzten gezeigten Zyklus vorgenommen. Dazu wurde der *COD* vor dem Zyklus ( $592 \text{ mg O}_2/\text{L}$ ) und nach einer Messdauer von sieben Tagen ( $349 \text{ mg O}_2/\text{L}$ ) bestimmt und die Differenz als zur Berechnung verwendet. Die Berechnung erfolgt analog Gleichung 4.7, jedoch wurde von vier Elektronen für die vollständige Oxidation zu  $\text{CO}_2$  ausgegangen und der *COD*-Wert durch die molare Masse von Sauerstoff ( $32 \text{ g}/\text{Mol}$ ) geteilt. Daraus ergibt sich eine *CE* von 66.23 %.

Wie aus Tabelle 4.5 zu entnehmen ist, liegen die *COD*-Werte für das Gelbwasser sowie die Zentratwässer deutlich höher als bei dem Ablauf der Vorklärung, obwohl bei letzterem die höchsten Stromdichten gemessen wurden. Da der *COD* einen Summenparameter darstellt, kann es bei der Bestimmung unter anderem auch zu anderen oxidativen Vorgängen kommen, die nicht Kohlenstoff basiert sind. Daraus ergeben sich höhere Messwerte. Das bedeutet schließlich, dass in diesen Abwasser-

#### 4. Ergebnisse und Auswertung

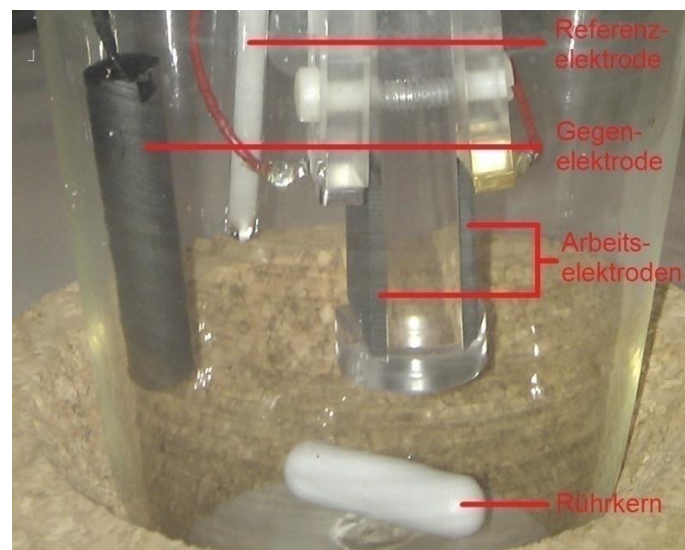
proben entweder mikrobiell schwerer abbaubare Stoffe vorhanden sind, oder aber ein hoher Anteil an bspw. Ammonium gegeben ist, was die Stromdichten und  $CEs$  sinken lässt und eine hemmende Wirkung ausüben könnte. Diese Ergebnisse stehen ein wenig im Widerspruch mit den Beobachtungen von *Rodrigo et al.* Dort wurde aktivierter Klärschlamm in einer Zweikammer-MFC genutzt, um städtische Abwässer zu untersuchen <sup>[57]</sup>. Eine Schlussfolgerung aus der dortigen Arbeit ist, dass die Leistung einer MFC steigt, je höher der COD des zu untersuchten Abwassers ist. Hierbei werden jedoch nur ca. 0.25 % des beseitigten  $CODs$  zur Stromerzeugung genutzt. Diese Ergebnisse konnten hier jedoch nicht bestätigt werden, da die Abwässer mit den höchsten  $CODs$  die niedrigsten Maximalstromdichten lieferten.

#### 4. Ergebnisse und Auswertung

### 4.5 Entwicklung eines Elektrodenhalters zur Untersuchung verschiedener Elektrodenmaterialien

#### 4.5.1 Graphit als Elektrodenmaterial

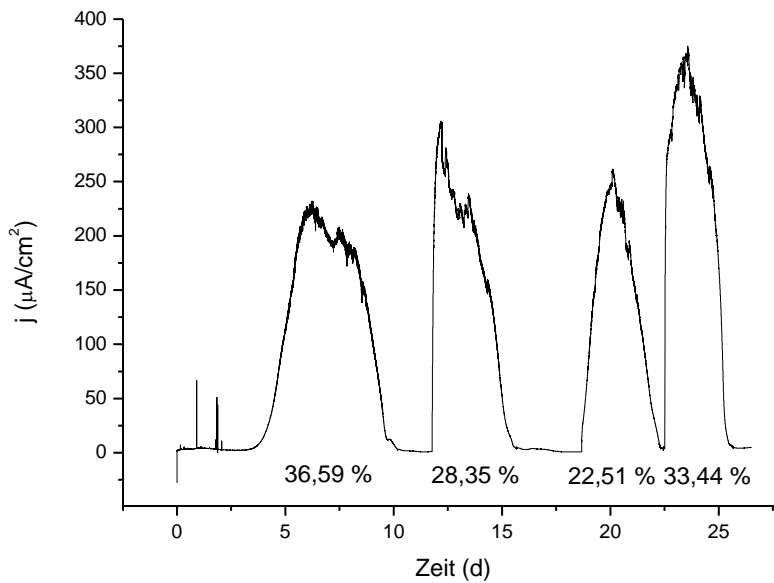
Um verschiedenste Elektrodenmaterialien miteinander vergleichen zu können, ist es sinnvoll, diese unter möglichst gleichen biologischen Bedingungen zu untersuchen. Messungen in unterschiedlichen Zellen zeigen immer eine biologische Varianz, die nicht vernachlässigt werden darf (siehe vorherige Ergebnisse). Zu diesem Zweck wurde mit Hilfe des Instituts für Halbleitertechnik (TU Braunschweig, Arbeitskreis Prof. Dr. A. Waag) ein Elektrodenhalter entworfen, der es ermöglicht, zwei Materialien gleichzeitig ohne großen Aufwand in derselben Zelle zu vermessen und deren Daten miteinander zu vergleichen. Der Aufbau der Zelle ist in Abbildung 4.17 zu sehen.



**Abbildung 4.17:** Aufbau einer Messzelle mit Elektrodenhalter.

Da dieser Halter zunächst auf generelle Tauglichkeit und Reproduzierbarkeit hin untersucht werden musste, wurden zuerst zwei Graphitblöcke (als bekanntes Elektrodenmaterial) in den Elektrodenhalter eingespannt und mit Acetat als Substrat (10 mM) vermessen. Die Ergebnisse der chronoamperometrischen Messungen sind in Abbildung 4.18 dargestellt.

#### 4. Ergebnisse und Auswertung

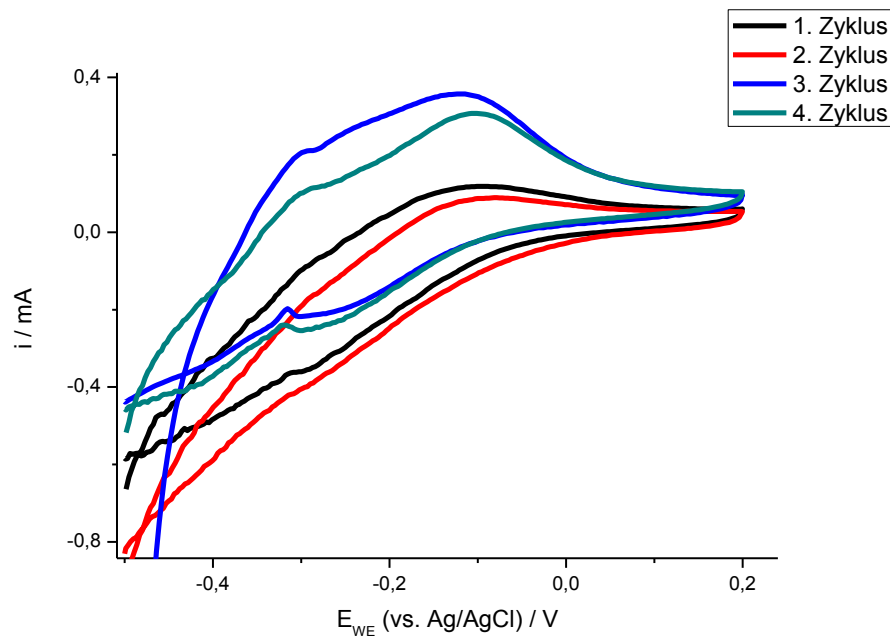


**Abbildung 4.18:** Chronoamperogramm der ersten Versuchsreihe des Elektrodenhalters (Graphit als Elektrodenmaterial). Es wurden 4 Zyklen bei einer Temperatur von 35 °C gemessen, das angelegte Potential betrug 0.2 V (vs. Ag/AgCl). Die Zahlen unter den Zyklen stellen die Coulombschen Effizienzen der jeweiligen Zyklen dar.

Während der erste Zyklus einen längeren Zeitraum einnahm, dafür aber nur einen geringen Maximalstrom erreicht, waren die Verläufe der folgenden Zyklen kürzer, lieferten aber höhere Stromdichten. In dieser Versuchsreihe stellte sich nach dem vierten Zyklus eine Maximalstromdichte von  $374.4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  ein, was im Vergleich zu den unter Kapitel 4.2.1 ermittelten Daten zu gering ist. Auch die CEs lagen mit einem Wert von  $30.2 \pm 6.2 \%$  in einem zu niedrigen Bereich. Dies könnte jedoch am Verhältnis zwischen Elektrodenoberfläche und Kolbenvolumen liegen, welches hier geringer ist, als in den vorher erwähnten Messungen. Des Weiteren war nach vier Zyklen kein ausgeprägter Biofilm auf den beiden Anoden zu erkennen. Daraufhin wurde die Zelle auseinander gebaut und die beiden Graphitelektroden genauer untersucht. Durch Abwischen mit einem Papiertuch, konnte letztlich ein dünner, rötlicher Biofilm nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass auf den Elektroden eine Biofilmbildung stattfindet (vgl. Kapitel 4.1).

Ein Vergleich der Zyklovoltammogramme während der ersten Zyklen bestätigt ebenfalls die Ausbildung eines elektrochemisch aktiven Biofilms (Abbildung 4.19).

#### 4. Ergebnisse und Auswertung



**Abbildung 4.19:** Zyklovoltammogramme nach den ersten vier Zyklen. Die Elektroden sind in Reihe geschaltet, die scan-rate betrug 1 mV/s.

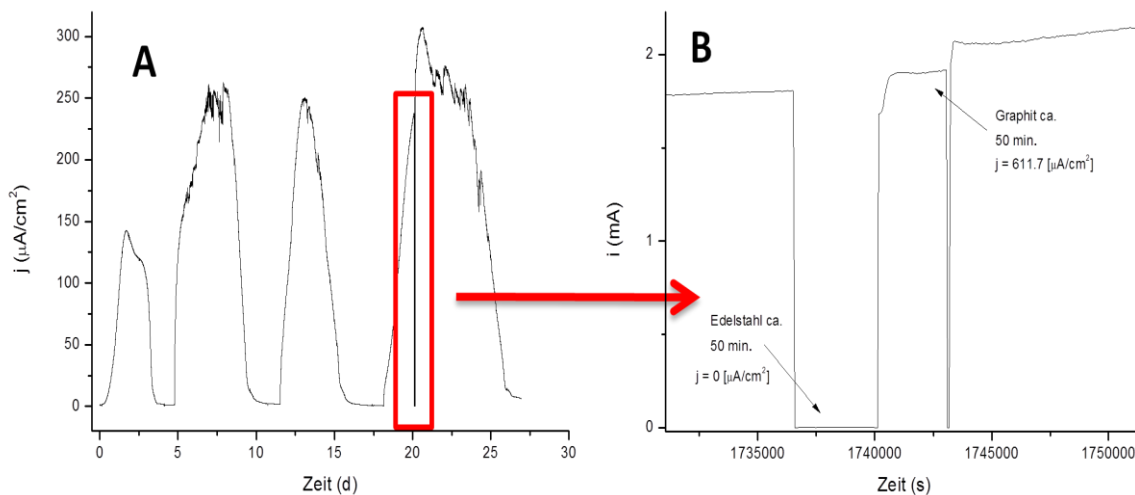
Deutlich ist zu erkennen, dass die CVs von Zyklus zu Zyklus definierter in ihrer Struktur werden und sich so mehrere Redox-Systeme abzeichnen. Jedoch sind die CVs etwas verzerrt, was an der Konnektivität der Graphitelektroden gelegen haben kann. Durch die nicht ganz optimale Konnektivität (jeweils oben ein Abnehmer, der nicht in das Material eindringt, sondern nur auf dem Material anliegt) können auch die ermittelten zu niedrigen Maximalstromdichten erklärt werden. Eventuell war die Leitfähigkeit durch die Verbindung zum Halter nicht ausreichend, sodass sich zu hohe Eigenwiderstände ergaben, die dadurch einen  $iR$ -Abfall begünstigten. Die Biofilmbildung könnte dadurch gehindert werden. Positiv ist nach den ersten Messungen aufgefallen, dass es zu keinerlei sichtbarer Korrosion weder direkt am Halter, noch an den Kontakten kam.



#### 4. Ergebnisse und Auswertung

##### 4.5.2 Edelstahl als Elektrodenmaterial

In einer zweiten Versuchsreihe wurde zusätzlich zum Graphit als Elektrodenmaterial Edelstahl verwendet (geometrische Oberfläche jeweils  $3.8 \text{ cm}^2$ ). Hierfür wurde die Zelle komplett gesäubert und alle Einzelteile autoklaviert, um eine identische Ausgangssituation zu schaffen und die Vergleichbarkeit mit den Daten aus der ersten Versuchsreihe zu gewährleisten. Auch hier betrug die Konzentration an Acetat  $10 \text{ mM}$ . Das Chronoamperogramm der gemessenen Zyklen findet sich in Abbildung 4.20.



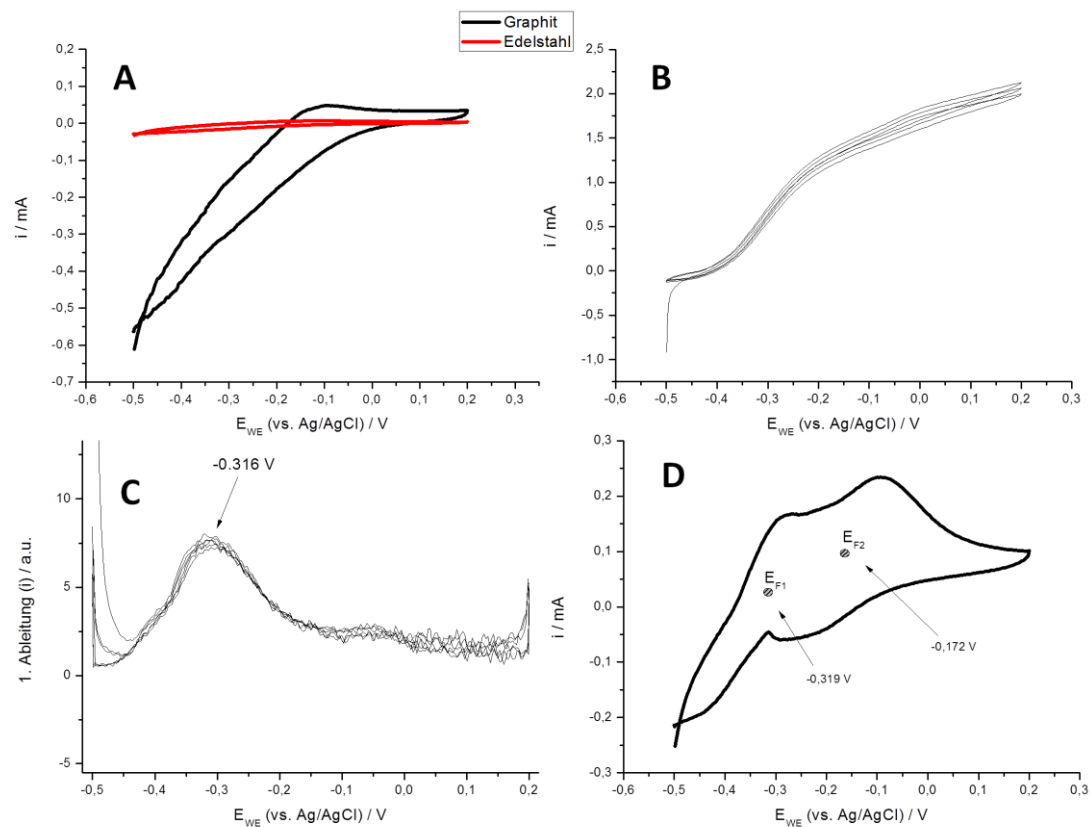
**Abbildung 4.20:** Chronoamperogramm der Messungen mit Graphit und Edelstahl als Anodenmaterialien (A), sowie die Vergrößerung des rot markierten Teilbereichs (B). Es wurden vier Zyklen bei einer Temperatur von  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  gemessen, das angelegte Potential betrug  $0.2 \text{ V}$  (vs.  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ), die Konzentration an Acetat  $10 \text{ mM}$ .

Wiederum konnten nicht die erwarteten Ströme erreicht werden. Die Maximalstromdichte betrug hier  $305.84 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . Während des vierten Zyklus wurden die Elektroden einzeln angesteuert, um zu ermitteln, welchen Anteil die einzelnen Materialien zum gemessenen Gesamtstrom beitrugen (Abbildung 4.20 B). Dazu wurde die Messung an Tag 20 pausiert und zunächst nur die Edelstahlelektrode kontaktiert. Sofort fiel auf, dass der Strom auf annähernd null sinkt. Nach erneutem Pausieren der Messung wurde nun die Graphitelektrode kontaktiert und ein sofortiger Anstieg des Stro-

#### 4. Ergebnisse und Auswertung

mes registriert. Dies zeigt eindeutig, dass der (nahezu) gesamte Strom von der Graphitelektrode ausging und die Edelstahlelektrode nur einen verschwindend geringen Beitrag lieferte. Weiterhin ist dadurch klar, dass der gemessene Maximalstrom nun auf etwa den doppelten Betrag ansteigen muss (da die Flächen der Elektroden gleich groß sind, s.o.). Nun errechnet sich die Maximalstromdichte zu  $611.7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ .

Durch den Vergleich der CVs, die während des dritten Zyklus von den einzelnen Elektroden aufgezeichnet wurden, lässt sich die Biofilmbildung auf beiden Elektrodenmaterialien vergleichen (Abbildung 4.21).



**Abbildung 4.21:** Vergleich der Zyklovoltammogramme der Elektrodenmaterialien Graphit und Edelstahl während des dritten Zyklus (A), turnover CV der in Reihe geschalteten Elektroden (B), erste Ableitung von A (C), non-turnover CV der in Reihe geschalteten Elektroden (D). Die scan-rate betrug jeweils  $1 \text{ mV/s}$ .

#### 4. Ergebnisse und Auswertung

Während sich auf der Edelstahlelektrode nach dem dritten Zyklus kein Biofilm ausgebildet hat, ist im CV der Graphitelektrode nach einiger Zeit die Ausbildung eines Biofilms zu erkennen (Abbildung 4.21 **A**). Aus der ersten Ableitung des turnover CVs und dem Vergleich mit dem non-turnover CV lässt sich das Formalpotential zu  $-0.319\text{ V}$  bestimmen, dies liegt damit etwas höher als bei vorher beschriebenen Experimenten mit Acetat. Die dargestellten Ergebnisse der in Reihe geschalteten Elektroden decken sich mit den Ergebnissen der einzeln angesteuerten Elektroden.

Um die Kontaktierung als mögliches Problem auszuschließen, wurde im Anschluss an die Experimente die Konnektivität mit einem Multimeter getestet. Hier wurden Werte von  $1.3\ \Omega$  für die Graphitelektrode und  $0.7\ \Omega$  für die Edelstahlelektrode gemessen. Folglich konnte ein zu hoher Widerstand als Fehlerquelle ausgeschlossen werden.

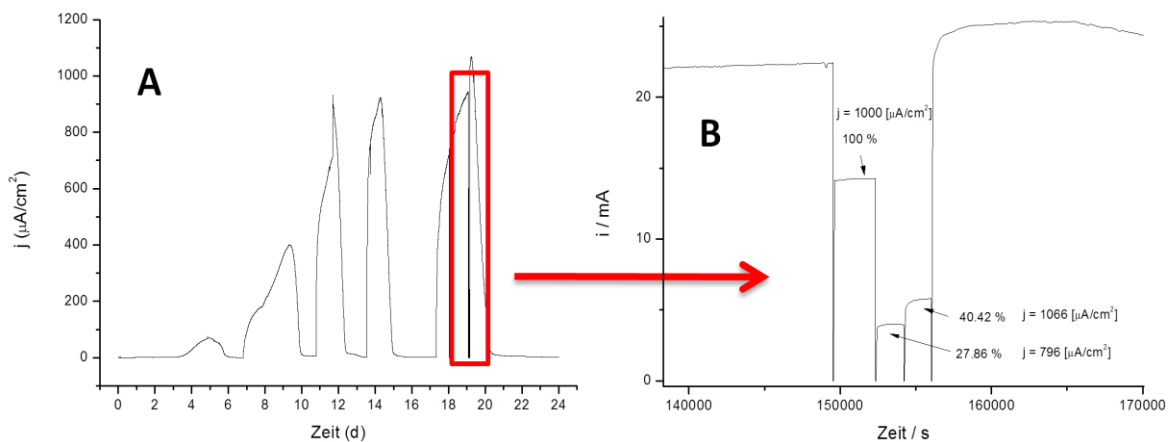
Mithilfe dieser Versuchsreihe stellte sich heraus, dass sich der verwendete Edelstahl nicht als Elektrodenmaterial in einer MFC zu eignen scheint. Eventuell liegt dies an der zu glatten Struktur der Oberfläche. Graphit beispielsweise zeigt eine viel strukturiertere Oberfläche an der sich die Mikroorganismen deutlich besser anhaften können. Ähnliches konnten auch *Sangeetha* und *Muthukumar* zeigen indem sie unter anderem Graphit und Edelstahl als Anodenmaterialien miteinander verglichen haben <sup>[58]</sup>. In diesem Zusammenhang erläutern sie ebenfalls, dass die bakterielle Adhäsion größer wird, je rauer die Oberfläche des zu untersuchenden Anodenmaterials ist. Im Gegensatz dazu konnte von *Dumas et al.* gezeigt werden, dass sich eine mit 6 % Molybden versehene Edelstahlkathode durchaus in marinen MFCs zur Verwendung eignet. Es konnten Stromdichten bis zu  $14\ \mu\text{A}/\text{cm}^2$  generiert werden <sup>[59]</sup>.

#### 4.5.3 Untersuchung der Konnektivität

Da die genannten Stromdichten weiterhin niedriger als erwartet waren, wurde zur Überprüfung der Biofilmbildung ein Experiment mit einer zusätzlichen Graphit-Stabelektrode (vgl. Kapitel 3.2.1, geometrische Oberfläche  $13.35\ \text{cm}^2$ ) durchgeführt. Würde sich hier ein sichtbarer Biofilm ausbilden, jedoch nicht auf den Elektroden im Halter (geometrische Oberflächen:  $5, 5.41\ \text{cm}^2$ ), so wäre dies eine Erklärung für die

#### 4. Ergebnisse und Auswertung

niedrigen Stromdichten. Die Chronoamperogramme dieser Versuchsreihe sind in Abbildung 4.22 dargestellt.



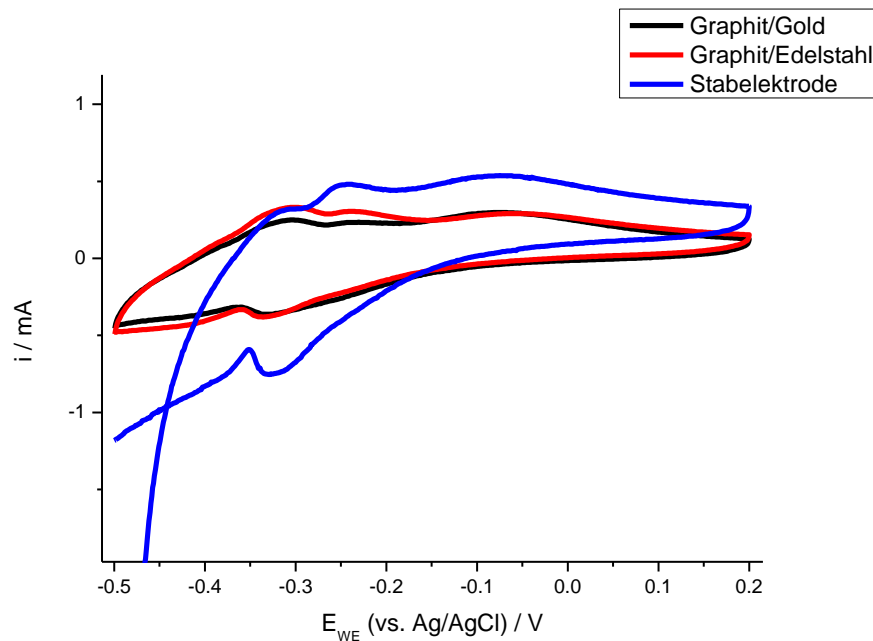
**Abbildung 4.22:** Chronoamperogramm der Versuchsreihe des Elektrodenhalters mit 2 Graphitelektroden und einer Graphit-Stabelektrode (**A**) sowie die Vergrößerung des rot markierten Teilbereichs (**B**). Es wurden 5 Zyklen bei einer Temperatur von 35 °C gemessen, das angelegte Potential betrug 0.2 V (vs. Ag/AgCl). Die Konzentration an Acetat betrug 10 mM (Zyklen 1-4) sowie 20 mM bei Zyklus 5.

Bereits nach drei Zyklen stellte sich ein konstantes Maximum um  $923.1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  bei den in Reihe geschalteten Elektroden ein. Damit lagen die Maximalstromdichten im erwarteten Bereich. Sogar eine Verdoppelung der Substratkonzentration von 10 mM auf 20 mM liefert kaum höhere Stromdichten. Lediglich die Zeit, die der Zyklus dauerte verlängert sich entsprechend der Erwartungen. Während des fünften Zyklus wurden die Elektroden einzeln für einen Zeitraum von je ca. 30 Minuten angesteuert um zu ermitteln, welchen Anteil die einzelnen Elektroden am Gesamtstrom lieferten. Da sich die Kurve zum Zeitpunkt der Messungen in einem leicht steigenden Abschnitt befand, werden hier die Anteile rein qualitativ untersucht. Wird nun der Strom, der bei der Kontaktierung der Stabelektrode von 14.25 mA gemessen wird auf 100 % normiert, so ergeben sich für die anderen beiden Elektroden Werte von 27.86 % und 40.42 % (Abbildung 4.22 **B**). Daraus errechnet sich die Stromdichten zu 1066 bzw.  $796 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . Der Wert für die Graphitelektrode mit Goldkontaktierung lag damit über dem erwarteten Wert, jedoch noch innerhalb der Größenordnung. Die Graphitelektrode mit Edelstahlkontaktierung lag genau im erwarteten Bereich. Somit ist deutlich,

#### 4. Ergebnisse und Auswertung

dass eine ausreichende Kontaktierung gewährleistet ist. Auch die  $CEs$  sind hier deutlich höher und liegen bei den letzten drei Zyklen bei  $83.04 \pm 2.69 \%$ . Gründe für die Stromdichten knapp über  $1000 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  können durch Messungenauigkeiten begründet sein, die sich ergeben, da sich die Messkurve zum Zeitpunkt der Einzelkontaktierung nicht in einer stationären Phase befand.

Der Vergleich der CVs nach dem fünften Zyklus ist in Abbildung 4.23 dargestellt.

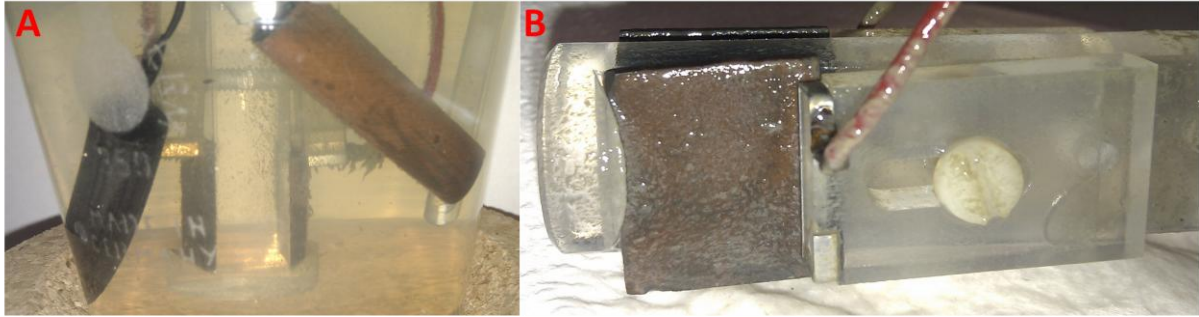


**Abbildung 4.23:** Vergleich der non-turnover CVs nach dem fünften Zyklus. Die scan-rate betrug 5 mV/s.

In diesem Vergleich ist deutlich zu sehen, dass die beiden Elektroden im Halter einander sehr ähnliche CVs lieferten. Das CV der Stabelektrode zeigte etwas höhere Ströme, was auf die größere Oberfläche zurückzuführen ist. Insgesamt sind die Redox-Zentren durch die gewählte scan-rate von 5 mV/s nicht so stark ausgebildet, als es im Vergleich zu 1 mV/s wäre.

Letztendlich konnten sich sowohl auf der Stabelektrode als auch auf den Graphitblöcken rötlich-braune Biofilme ausbilden (Abbildung 4.24).

#### 4. Ergebnisse und Auswertung



**Abbildung 4.24:** Ausgebildeter Biofilm auf der Extraelektrode (A) sowie auf einem der Graphitblöcke (B).

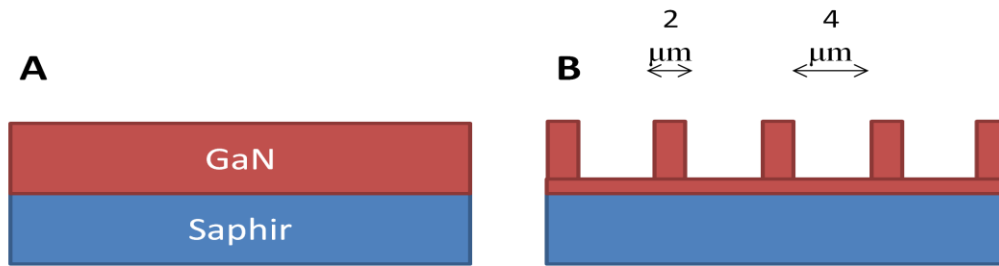
Damit einher ging nun auch der Beweis, dass sich der Halter nach den ersten Erprobungen durchaus als geeignet erwiesen hat, um damit verschiedene Materialien genauer untersuchen zu können.

#### 4.5.4 Galliumnitrid als Elektrodenmaterial

In weiteren Experimenten wurden verschiedene mit Galliumnitrid (**GaN**) beschichtete Saphirplatten als Anodenmaterial getestet. GaN ist ein III-V-Halbleiter, der in einem speziellen Verfahren auf Saphir als Trägermaterial aufgebracht und anschließend nanostrukturiert werden kann. GaN wird in der Industrie vor allem im Bereich der LED-Technik eingesetzt <sup>[60]</sup>. In diesen ersten Versuchen wurden zwei Arten von Oberflächen getestet. Zum einen eine glatte, unstrukturierte Oberfläche, zum anderen eine Oberfläche, die mit sogenannten nano-Pillars (kleine in regelmäßigen Abständen verteilte Erhebungen) versehen ist.

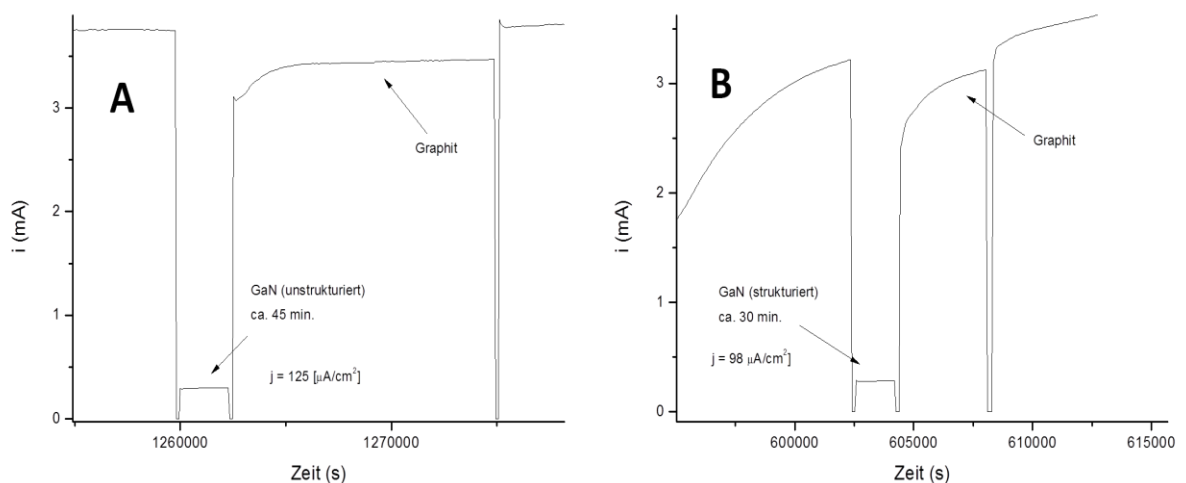
Die beiden Oberflächen sind beispielhaft in Abbildung 4. 25 dargestellt.

#### 4. Ergebnisse und Auswertung



**Abbildung 4.25:** Beispielhafte Darstellung der verwendeten GaN-Elektroden. Unstrukturiert (A) und mit Nano-Pillars versehen (B).

Bei der nanostrukturierten Oberfläche befanden sich Erhebungen in der GaN-Schicht, die einen Durchmesser von 2 µm aufwiesen. Der Abstand zwischen den einzelnen Erhebungen betrug 4 µm, war also groß genug, sodass sich einzelne Mikroorganismen dazwischen anlagern könnten. In den folgenden Untersuchungen soll der Effekt der Oberflächenbeschaffenheit des GaN auf die Bildung und Leistungsfähigkeit eines elektrochemisch aktiven Biofilms untersucht werden. Dazu wurde als Inokulum jeweils ein zuvor mit Acetat gezogener Biofilm in der Lösung resuspendiert, sodass sich ein sekundärer Biofilm ausbilden konnte. Vergrößerte Teilausschnitte aus den Chronoamperogrammen beider Versuchsreihen sind in Abbildung 4.26 dargestellt.



**Abbildung 4.26:** Vergrößerte Teilbereiche der Chronoamperogramme aus den Versuchen mit GaN modifizierten Oberflächen. GaN unstrukturiert (A), GaN mit nano-Pillars versehen (B).

#### 4. Ergebnisse und Auswertung

Wie Abbildung 4.26 zu entnehmen ist, zeigten beide untersuchten Materialien Stromdichten um  $100 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . Die unstrukturierte Elektrode zeigte sogar eine um ca. 22 % höhere Stromdichte als die strukturierte Oberfläche. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die beiden Materialien unterschiedlich gut kontaktiert werden konnten, was sich in den gemessenen Widerständen widerspiegelt (ca.  $150 \Omega$  für die unstrukturierte Elektrode, Widerstände im  $\text{k}\Omega$ -Bereich für die strukturierte Elektrode). Daher ist davon auszugehen, dass sich beide Materialien gleich gut eignen. Die Oberfläche spielt an dieser Stelle scheinbar nur eine untergeordnete Rolle und durch die Strukturierung (und der damit einhergehenden höheren Oberflächenrauigkeit) haben die Mikroorganismen keine Möglichkeit besser am Material zu haften. In weiteren Versuchen könnte daran gearbeitet werden, die Kontaktierung zu verbessern und gegebenenfalls mikroskopische Aufnahmen der untersuchten Materialien anzufertigen und miteinander zu vergleichen.



## 5. Zusammenfassung und Ausblick

### 5.1 Untersuchungen an Monosubstraten

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Monosubstrate Acetat, Mannitol, Glycerin und Zitronensäure ihrerseits eine gute Verwendbarkeit als Substrate in mikrobiellen Brennstoffzellen zeigen. Dabei wurde mit Mannitol die höchste Maximalstromdichte erreicht ( $783.72 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ). Acetat ( $751.22 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ), Zitronensäure ( $691.37 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) und Glycerin ( $374.45 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) zeigten etwas geringere Stromdichten. Bei gleichzeitig hohen Stromdichten zeigte Acetat die höchste Coulombsche Effizienz ( $83.93 \pm 0.83 \%$ ), während die anderen Substrate Werte um 40-60 % lieferten.

Die unter Kapitel 4.2.2 beschriebenen Ergebnisse der Sequenzanalysen zeigten deutlich, dass sich durch die Verwendung verschiedener Substrate weitestgehend ähnliche mikrobielle Kulturen in den anodischen Biofilmen ausbilden. Vor allem die Abteilung der *Proteobacterien* konnte in allen Proben angereichert werden. Bei genauerer Betrachtung stellte sich heraus, dass besonders *Geobacter spec.* in den Biofilmen dominieren. Hier konnte ein linearer Zusammenhang zwischen maximalen Stromdichten und dem Anteil an *Geobacter spec.* aufgezeigt werden. Dadurch wird abermals klar, welche Schlüsselrolle diese Spezies in elektrochemisch aktiven Biofilmen spielen. Lediglich die auf Mannitol gezogenen Biofilme wurden nicht durch *Geobacter spec.*, sondern durch die Familie der *Clostridiaceae* dominiert. Generell konnte auch gezeigt werden, dass die Verwendung niedermolekularer Substrate (kurzkettige Alkohole oder Säuren) zu einer einfacheren mikrobiellen Zusammensetzung in den Biofilmen führte als die Verwendung höher molekularer Substrate (z.B. Zucker).

Anknüpfend an den hier durchgeführten Versuchsreihen könnten in zukünftigen Untersuchungen weitere Substrate angeboten werden und die Studien der daraus resultierenden molekularen Ökologie vertieft werden. Dabei sollte jedoch in Betracht gezogen werden, die Anzahl der zu messenden Zyklen zu erhöhen, um etwaige Varianzen in den Messzellen zu minimieren. Weiterhin kann der Zusammenhang zwischen verwendeten Substraten, maximalen Stromdichten und Zusammensetzung des Biofilms vertiefend studiert werden. Dazu können beispielsweise multivariable



## 5. Zusammenfassung und Ausblick

hingegen können im Vergleich von Acetat und Zitronensäure (hellblau) ermittelt werden, da diese auch die größte räumliche Trennung besitzen.

## 5.2 Untersuchungen an Mischsubstraten und realen Abwässern

Die Verwendung von Mischsubstraten zur Biofilmbildung zeigte durchweg geringere Stromdichten und Coulombsche Effizienzen als die Verwendung von Monosubstraten. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Mikroorganismen einen längeren Adaptionszeitraum benötigten als es bei den Monosubstraten der Fall war und sich wahrscheinlich komplexere Communities ausgebildet haben. Die maximal erreichten Stromdichten und Coulombschen Effizienzen wurden mit der Substratmischung Glycerin/Mannitol gefunden ( $72.56 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ , 46.52 %), diese liegen jedoch deutlich unter den mit den Monosubstraten.

Auch die untersuchten realen Abwässer konnten bis auf „Ablauf Vorklämung“ nicht überzeugen. Hier konnten jedoch Stromdichten bis zu  $142.23 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  bei einer Coulombschen Effizienz von 66.23 % erreicht werden. Die durch diese Arbeit erlangten Ergebnisse können dazu genutzt werden um den in Kapitel 4.4 beschriebenen Prototypen effektiver zu betreiben, dessen Leistungsfähigkeit zu optimieren und die ablaufenden Vorgänge besser zu verstehen.

Interessant für Folgearbeiten wäre auch hier die Untersuchung der molekularen Ökologie und die Abhängigkeit von ausgewählten Substratmischungen bzw. Abwässern. Um herauszufinden, woran die niedrigeren Performances liegen, könnte in nachfolgenden Arbeiten durch die Analyse der anodischen Biofilme – ähnlich wie in Kapitel 4.2.2 – die mikrobielle Zusammensetzung ermittelt und ausgewertet werden. Daraus können dann weitere Rückschlüsse über den Zusammenhang der dominierenden Spezies im Biofilm und deren Abhängigkeit zur verwendeten Substratmischung erlangt werden. Sehr wahrscheinlich wird hier die mikrobielle Zusammensetzung deutlich komplexer ausfallen, als es der Fall bei den untersuchten Einzelsubstraten ist. Weiterhin könnten einige Abwässer auf ihre organische Fracht hin untersucht werden um herauszufiltern, welche Stoffklassen dominieren und sich gut als Substrate eig-

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

nen. Außerdem könnten verschiedene Substratmischungen und Abwässer an bereits ausgebildeten Biofilmen (bspw. auf Acetat gezogen) getestet werden. Dadurch könnten weitere Abhängigkeiten ermittelt und studiert werden.

### **5.3 Entwicklung eines Elektrodenhalters zur Untersuchung verschiedener Elektrodenmaterialien**

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der vorgestellte Elektrodenhalter repräsentative und reproduzierbare Ergebnisse liefert. Hierbei wurden vier verschiedene Elektrodenmaterialien getestet. Die letztlich mit Graphit erreichten Maximalstromdichten ( $923.07 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) reichten an die in der Literatur beschriebenen Werte heran und auch die *CEs* lagen mit über 80 % ebenfalls im angestrebten Bereich (vgl. Kap. 4.2).

Eine Weiterentwicklung des Halters könnte in der Modifizierung der Geometrie liegen, sodass dieser Platz für weitere Elektroden bietet. Dadurch könnten in nur einer Messzelle dann etwa vier verschiedene Materialien gleichzeitig getestet werden. Weiterhin könnte auch die Kontaktierung verbessert werden, indem die Kontaktflächen besser in das zu untersuchende Material eindringen oder aber eine doppelte Kontaktierung stattfindet (jeweils ein Abnehmer oben und unten).

Weiterhin ergeben sich viele neue Möglichkeiten diesen Halter zu nutzen. Beispielsweise können neuartige beschichtete, halbdurchlässige Elektrodenmaterialien getestet werden, durch die mithilfe spektroskopischer Methoden (konfokale Raman-Spektroskopie, FT-IR Spektroskopie) Biofilme in situ charakterisiert werden könnten. Hierzu müsste in den Halter lediglich die entsprechende Technik integriert werden.

## 6. Literaturverzeichnis

- [1] M. Wink, *Molekulare Biotechnologie. Konzepte und Methoden*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
- [2] Vereinte Nationen, *World Population Prospects: The 2010 Revision*, **2011**.
- [3] British Petrol, *Statistical Review of World Energy*, **2005**.
- [4] Vereinte Nationen, *Rahmenübereinkommen der Vereinten Nationen über Klimaänderungen*, **1992**.
- [5] Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, *Entwicklung der erneuerbaren Energien in Deutschland im Jahr 2011*, **2012**.
- [6] N. u. R. Bundesministerium für Umwelt, *Langfristszenarien und Strategien für den Ausbau der erneuerbaren Energien in Deutschland bei Berücksichtigung der Entwicklung in Europa und global. Zusammenfassung des Schlussberichts*, **2012**.
- [7] EWE Biogas GmbH & Co. KG, online verfügbar unter:  
[http://www.ewe-biogas.de/index\\_30.php](http://www.ewe-biogas.de/index_30.php) (Stand 02.05.2012).
- [8] K. Rabaey, *Bioelectrochemical systems. From extracellular electron transfer to biotechnological application*, IWA Publishing, London, New York, **2010**.
- [9] K. Munk, *Mikrobiologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2008**.
- [10] H. Cypionka, *Grundlagen der Mikrobiologie*, Springer, Berlin ;, Heidelberg, **2010**.
- [11] D. M. Rossi, J. B. da Costa, E. A. de Souza, M. d. C. R. Peralba, M. A. Z. Ayub, *Renewable Energy* **2012**, 39, 223–227.
- [12] F. Caccavo Jr., D. J. Lonergan, D.R Lovley, M. Davis, J. F. Stolz, M. J. McInerney, *Applied and Environmental Microbiology* **1994**, 3752–3759.
- [13] D. R. Lovley, J. F. Stolz, G. L. Nord, E. J. Phillips [JR.] **1987**, 19, 252–254.
- [14] W. C. Lin, M. V. Coppi, D. R. Lovley, *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, 4.
- [15] K. P. Nevin, P. Zhang, A E. Franks, T. L. Woodard, D. R. Lovley, *Journal of Power Sources* **2011**, 196, 7514–7518.
- [16] G. Fuchs, H. G. Schlegel, T. Eitinger, *Allgemeine Mikrobiologie. 53 Tabellen*, Thieme, Stuttgart, **2007**.
- [17] P. Christen, R. Jaussi, *Biochemie. Eine Einführung mit 40 Lerneinheiten*, Springer, Berlin, **2005**.

## 6. Literaturverzeichnis

- [18] R. Mahadevan, D. R. Bond, J. E. Butler, A. Esteve-Nunez, M. V. Coppi, B. O. Palsson, C. H. Schilling, D.R Lovley, *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *2*, 1558–1568.
- [19] W. Reineke, M. Schlömann, *Umweltmikrobiologie*, Spektrum, München, **2007**.
- [20] R. Singh, D. Paul, R. K. Jain, *Trends in Microbiology* **2006**, *14*, 389–397.
- [21] S. Patil, F. Harnisch, U. Schröder, *ChemPhysChem* **2010**, *11*, 2834–2837.
- [22] K. Rabaey, W. Verstraete, *Trends in Biotechnology* **2005**, *23*, 291–298.
- [23] U. Schröder, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9*, 2619.
- [24] N. S. Malvankar, M. Vargas, K. P. Nevin, A. E. Franks, C. Leang, B.-C. Kim, K. Inoue, T. Mester, S. F. Covalla, J. P. Johnson et al., *Nature Nanotech* **2011**, *6*, 573–579.
- [25] D. R. Bond, D. R. Lovley, *Applied and Environmental Microbiology* **2003**, *3*.
- [26] C. H. Hamann, W. Vielstich, *Elektrochemie*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
- [27] P. W. Atkins, J. de Paula, *Physikalische Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim, **2006**.
- [28] B. Speiser, *Chemie in unserer Zeit* **1981**, *15*, 21–26.
- [29] S. K. Chaudhuri, D. R. Lovley, *Nat Biotechnol* **2003**, *21*, 1229–1232.
- [30] J. Heinze, *Angewandte Chemie* **1984**, *96*, 823–916.
- [31] F. Harnisch, S. Freguia, *Chem. Asian J.* **2012**, *7*, 466–475.
- [32] E. Marsili, D. B. Baron, I. D. Shikhare, D. Coursolle, J. A. Gralnick, D. R. Bond, *PNAS* **2008**, *105*, 3968–3973.
- [33] U. Schröder, *ChemSusChem* **2008**, *1*, 281–282.
- [34] S. I. Chang, H. Moon, O. Bretschger, J. K. Jang, H. I. Park, K. H. Neilson, B. H. Kim, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *2*, 163–177.
- [35] S. A. Patil, F. Harnisch, C. Koch, T. Hübschmann, I. Fetzer, A. A. Carmona-Martínez, S. Müller, U. Schröder, *Bioresource Technology* **2011**, *102*, 9683–9690.
- [36] B. Virdis, F. Harnisch, D. J. Batstone, K. Rabaey, B. C. Donose, *Energy and Environmental Science* **2012**, *5*, 7017–7024.
- [37] C. I. Torres, R. Krajmalnik-Brown, P. Parameswaran, K. A. Marcus, G. Wanger, Y. A. Gorby, B E. Rittmann, *Environmental Science and Technology* **2009**, *43*, 9519–9524.
- [38] Z. Du, H. Li, T. Gu, *Biotechnology Advances* **2007**, *25*, 464–482.
- [39] D. Pant, G. van Bogaert, L. Diels, K. Vanbroekhoven, *Bioresource Technology* **2010**, *101*, 1533–1543.

## 6. Literaturverzeichnis

- [40] S. A. Patil, *Dissertation*, TU Braunschweig, Braunschweig, **2010**.
- [41] T. Catal, K. Li, H. Bermek, H. Liu, *Journal of Power Sources* **2008**, 175, 196–200.
- [42] W. E. Balch, G.E Fox, L. J. Magrum, C. R. Woese, R. S. Wolfe, *Microbiol. Rev.* **1979**, 260–296.
- [43] J. R. Kim, B. Min, B. E. Logan, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, 23–30.
- [44] Z. Liu, C. Lozupone, M. Hamady, F. D. Bushman, R. Knight, *Nucleic Acid Research* **2007**, 35, 3–10.
- [45] Y. Wang, P.-Y Qian, *Plos One* **2009**, 4.
- [46] V. R. Nimje, C.-Y Chen, C.-C Chen, H.-R Chen, M.-J Tseng, J.-S Jean, Y.-F Chang, *Bioresource Technology* **2011**, 2629–2634.
- [47] M. Winter, R. Bock, C. Herrmann, H. Stache, H. Wichmann, M. Bahadir, *Journal of Cleaner Production* **2012**, 35, 176–182.
- [48] S. Xu, H. Liu, *Journal of Applied Microbiology* **2011**, 1108–1115.
- [49] J. J. Bozell, L. Moens, D. C. Elliott, Y. Wang, G. G. Neuensewander, S. W. Fitzpatrick, R. J. Bilski, J. L. Jarnefeld, *Resources, Conservation and Recycling* **2000**, 227–239.
- [50] J. R. Kim, S. H. Jung, J. M. Regan, B. E. Logan, *Bioresource Technology* **2007**, 2568–2577.
- [51] H. Friman, A. Schechter, Y. Nitzan, R. Cahan, *Microbiology* **2012**, 158, 414–423.
- [52] J. Choi, H. N. Chang, J.-I Han, *Biotechnol. Lett.* **2011**, 705–714.
- [53] T. Catal, S. Xu, K. Li, H. Bermek, H. Liu, *Biosensors and Bioelectronics* **2008**, 24, 849–854.
- [54] S. A. Patil, F. Harnisch, B. Kapadnis, U. Schröder, *Biosensors and Bioelectronics* **2010**, 26, 803–808.
- [55] S. Venkata Mohan; S. Veer Raghavulu; P. N. Sarma, *Biosensors and Bioelectronics* **2008**, 24, 41–47.
- [56] I. S. Kim, K.-J Chae, M.-J Choi, W. Verstraete, *Environ. Eng. Res.* **2008**, 13, 51–65.
- [57] M. A. Rodrigo, P. Cañizares, J. Lobato, R. Paz, C. Sáez, J. J. Linares, *Journal of Power Sources* **2007**, 169, 198–204.
- [58] T. Sangeetha, M. Muthukumar, *Environ. Prog. Sustainable Energy* **2012**, 1–6.

## 6. Literaturverzeichnis

- [59] C. Dumas, A. Mollica, D. Féron, R. Basséguy, L. Etcheverry, A. Bergel, *Electrochimica Acta* **2007**, *53*, 468–473.
- [60] a) H. P. Maruska, *Appl. Phys. Lett.* **1969**, *15*, 327. b) A. Shintani, S. Minagawa, *J. Appl. Phys.* **1977**, *48*, 1522.
- [61] Y. Liu, F. Harnisch, K. Fricke, R. Sietmann, U. Schröder, *Biosensors and Bioelectronics* **2008**, *24*, 1006-1011.
- [62] M. Carlquist, R. L. Fernandes, S. Helmark, A.-L. Heins, L. Lundin, S. J. Sørensen, K. V. Gernaey, A. E. Lantz, *Microbial Cell Factories* **2012**, *94*, 1-13.