

Spektroelektrochemische In-situ-Untersuchung von elektrokatalytischen mikrobiellen Biofilmen mit oberflächenverstärkter Resonanz-Raman-Spektroskopie**

Diego Millo,* Falk Harnisch,* Sunil A. Patil, Hoang K. Ly, Uwe Schröder und Peter Hildebrandt

Metallreduzierende Bakterien spielen nicht nur in geochemischen Redoxkreisläufen eine Schlüsselrolle,^[1] sondern sind darüber hinaus von zunehmenden Interesse aufgrund ihrer Relevanz für mikrobielle bioelektrochemische Systeme, einer zukunftssträchtigen nachhaltigen Technologie.^[2] Dies liegt in der Fähigkeit der Bakterien begründet, Substrate wie Acetat zu oxidieren und die Elektronen an einen unlöslichen terminalen Elektronenakzeptor – wie eisenhaltige Mineralien oder die Anode eines mikrobiellen bioelektrochemischen Systems – zu transferieren. Der zugrundeliegende Mechanismus der Elektronenübertragung zwischen Bakterium und Elektrode kann variieren und tritt als direkter sowie als vermittelter Elektronentransfer (DET bzw. MET) auf.^[3] Im Fall von DET werden Elektronen aus der zellulären Atmungskette mittels einer komplexen Reaktionskaskade unter Verwendung von auf der äußeren Membran befindlichen Cytochromen (OMCs) zum anorganischen Zielmolekül transportiert.^[4] Bei den OMCs handelt es sich um Multihämaproteine, deren Funktion und Anzahl an Hämeinheiten innerhalb einer Bakterienfamilie stark variieren kann.^[4] Zahlreiche Untersuchungen konzentrierten sich bereits auf das Verhalten dieser in mikrobielle Biofilme eingebetteten Proteine am Beispiel von *Geobacter sulfurreducens*,^[5–7] dem Modellorganismus hinsichtlich DET. Trotz dieser Bemühungen liegt die Rolle dieser Cytochrome für den heterogenen Elektronentransfer an der Elektrodengrenzfläche noch weitgehend im Dunkeln. Dies ist verständlich, bedenkt man, dass Strukturdaten nur für zwei der am DET beteiligten OMCs, dem OmcF

und OmcZ,^[10,11] bekannt sind. In diesem Zusammenhang können spektroskopische Methoden, die in situ bei Biofilmen eingesetzt werden können, helfen, Strukturinformationen über die am DET beteiligte OMCs zu gewinnen.

Hier stellen wir erstmals eine spektroskopische In-situ-Charakterisierung von OMCs in einem intakten, katalytisch aktiven Biofilm vor. Im Unterschied zu früheren Studien an resuspendierten Zellen gelang hier erstmals eine In-situ-Untersuchung der elektrochemischen und spektroskopischen Eigenschaften unter natürlichen Bedingungen, die zu einem realistischeren Bild des Elektronentransfers führte.

Dazu wurden die oberflächenverstärkten Resonanz-Raman(SERR)-Spektroskopie und die Cyclovoltammetrie (CV) eingesetzt. Mithilfe der SERR-Spektroskopie, die den molekularen Resonanz-Raman-Effekt und den oberflächenverstärkten Raman-Effekt kombiniert, ist es möglich, ausschließlich die Hämgruppen von Biofilm-Proteinen nahe der Elektrodenoberfläche zu untersuchen.^[13,14] Diese Technik erlaubt Rückschlüsse auf den Redox-, Koordinations- und Spinzustand sowie auf die Art der axialen Liganden des Hämeisens und liefert, bei elektrochemischer Kontrolle der experimentellen Bedingungen, Strukturinformationen, die die rein elektrochemischen Daten aus CV-Experimenten ergänzen.^[15,16]

Gezüchtet wurden die Biofilme auf einer aufgerauten (d.h. SER-aktiven) Silberelektrode bei konstant angelegtem Potential mit 10 mM Acetat als Substrat (siehe Hintergrundinformationen für Details). Die so erhaltenen Biofilme produzieren eine chronoamperometrische Stromdichte von $600 \mu\text{A cm}^{-2}$ (Abbildung S12 in den Hintergrundinformationen), was in guter Übereinstimmung mit vorherigen Studien an Graphitelektroden steht.^[17] Voltammetrische Untersuchungen der Biofilme fanden unter katalytischen (Abbildung S13) und nicht-katalytischen (in An- bzw. Abwesenheit des Substrats, z.B. Acetat) Bedingungen statt.

In Abbildung 1 ist ein Cyclovoltammogramm eines solchen Biofilms unter nicht-katalytischen Bedingungen dargestellt. Die Redoxpaare $E_{f,1}$ und $E_{f,2}$, denen eine Beteiligung am DET zugeschrieben wird,^[18] weisen Formalpotentiale von -282 mV bzw. -363 mV auf. Die allgemeine Form des Cyclovoltammogramms sowie die Positionen der Redoxübergänge sind sehr ähnlich zu denen, die in parallelen Experimenten und in früheren Untersuchungen an Graphitelektroden beobachtet wurden.^[19] Dies legt den Schluss nahe, dass die Bildung des Biofilms nicht von der Art des Elektrodenmaterials beeinflusst wird. Aufgrund der Ähnlichkeit des Cyclovoltammogramms zu den Voltammogrammen an Reinkultur-Biofilmen von *Geobacter sulfurreducens* kann

[*] Dr. D. Millo, H. K. Ly, Prof. Dr. P. Hildebrandt
Institut für Chemie, Sekr. PC14, Technische Universität Berlin
Straße des 17. Juni 135, 10623 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-3142-1122
E-Mail: diego.millo@tu-berlin.de

Dr. F. Harnisch, S. A. Patil, Prof. Dr. U. Schröder
Institut für Ökologische und Nachhaltige Chemie
Technische Universität Braunschweig
Hagenring 30, 38106 Braunschweig, (Deutschland)
Fax: (+49) 531-391-8424
E-Mail: f.harnisch@tu-braunschweig.de

[**] Die Autoren danken Prof. Carlos Salgueiro für Hinweise zum Manuskript. Diese Arbeit wurde von der Alexander-von-Humboldt-Stiftung (D.M.), dem Fonds der Chemischen Industrie (F.H.), der DFG und dem Exzellenzcluster „UniCat“ (P.H.) gefördert. Die Stiftungsprofessur für „Nachhaltige Chemie und Energieforschung“ (U.S.) wird durch die Volkswagen AG und den Verband der Deutschen Biokraftstoffindustrie unterstützt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201006046> zu finden.

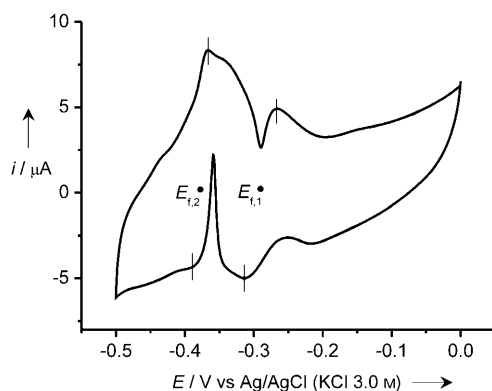


Abbildung 1. Cyclovoltammogramm eines mikrobiellen Biofilms auf einer Silberelektrode unter nicht-katalytischen Bedingungen (ohne Substrat). Experimente wurden in 100 mM Pufferlösung (pH 7) in Abwesenheit des Substrats durchgeführt. Die Potentialvorschubgeschwindigkeit betrug 1 mVs^{-1} .

gefolgert werden, dass der Biofilm von dieser Spezies dominiert wird.^[20] Gestützt wird diese Schlussfolgerung durch Ergebnisse parallel durchgeführter durchflusszytometrischer Charakterisierungen an auf Graphit gezüchteten Biofilmen unter identischen Bedingungen (gleiche Bakterienquelle, Substrat, Mediumzusammensetzung, Temperatur usw.).^[21] Darüber hinaus belegt diese Beobachtung, dass die nanostrukturierte Silberelektrode und die damit verbundene Anwesenheit von Ag^+ -Kationen keine toxische Wirkung auf das Bakterium ausübt. Dies ist im Einklang mit Ergebnissen von Law et al., denen es gelang, Zellen von *Geobacter sulfurreducens* unter Anwesenheit von Silberkolloiden zu züchten.^[22] Kürzliche Studien von Patil et al. legen eine ähnlich hohe Resistenz gegenüber Toxinen nahe.^[23]

Abbildung 2 zeigt SERR-Spektren eines auf einer aufgerauten Silberelektrode gezüchteten mikrobiellen Biofilms bei zwei verschiedenen Potentialen in Abwesenheit von Substrat. Die Marker-Banden bei 1375, 1506, 1588 und 1639 cm^{-1} (Abbildung 2, unten) sowie bei 1361, 1495 und 1592 cm^{-1} (Abbildung 2, oben) können eindeutig einem oxi-

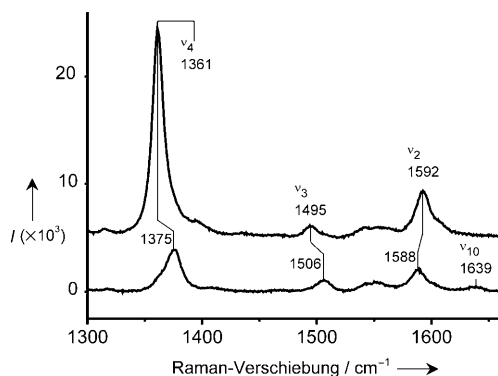


Abbildung 2. SERR-Spektren von reduzierten (oberes Spektrum) und oxidierten OMCs (unteres Spektrum) aufgenommen bei -425 bzw. 0 mV . Die Spektren wurden mit 413 nm Anregung, 1 mW Laserleistung und 90 s Akkumulationszeit gemessen. Potentiale beziehen sich auf eine Ag/AgCl -Referenzelektrode ($\text{KCl } 3.0 \text{ M}$; 210 mV vs. SHE).

dierten bzw. reduzierten *c*-Typ-Häm zugeordnet werden,^[24] sodass die SERR-Spektren insgesamt die prosthetische Gruppe von einem oder mehreren OMCs widerspiegeln, welche die Bakterien mit der Oberfläche verbinden. Sowohl Bandenpositionen als auch relative Intensitäten lassen auf eine sechsfach koordinierte Hämgruppe in der Low-Spin-Konfiguration mit zwei Histidinen als axiale Liganden schließen.^[24] Für eine potentiometrische Titration wurden SERR-Spektren bei konstanten Potentialen zwischen -425 und 0 mV aufgenommen. Mithilfe der Komponentenspektren der reinen oxidierten und reduzierten Form gelang eine Anpassung an die experimentellen Spektren, und aus dem jeweiligen Anteil der Komponenten wurden die relativen Konzentrationen der beiden Oxidationszustände berechnet.^[14,24,25] Wie in Abbildung 3 gezeigt ist, steigt der Anteil

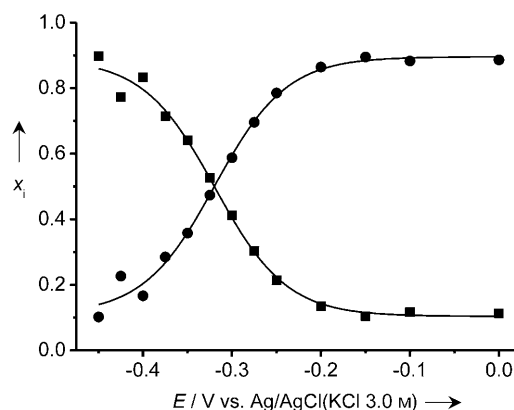


Abbildung 3. Relative Konzentrationen (als Stoffmengenanteil x_i) des oxidierten (●) und reduzierten Häm (■) als Funktion des Potentials. Die Kurven entsprechen dem Verlauf der angepassten Nernst-Gleichung mit einem Ein-Elektronen-Übergang. Die Daten entstammen der Komponentenanalyse der SERR-Spektren.

der reduzierten Spezies (■) mit sinkendem Elektrodenpotential, während der oxidierte Anteil (●) entsprechend abnimmt. Die Titration wurde von niedrigen zu hohen Potentialen und umgekehrt durchgeführt, ohne dabei signifikante Hystereseeffekte zu beobachten (Abbildung SI4). Lediglich ein kleiner Anteil der Hämgruppen (ca. 10 %) war redoxinaktiv, zu erkennen an dem auch bei sehr negativen bzw. positiven Potentialen nicht-reduzierbaren bzw. nicht-oxidierbaren Rest. Insgesamt zeigen diese Beobachtungen, dass die Redoxvorgänge der Cytochrome im Biofilm sowohl elektrochemisch kontrolliert werden können als auch vollständig reversibel sind. Bemerkenswerterweise besitzt der Biofilm katalytische Aktivität nach der Titration, was nahelegt, dass die Laserstrahlung keinen Einfluss auf die funktionellen Eigenschaften der Bakterien hat (Daten nicht gezeigt). Eine Anpassung der Nernst-Gleichung an die Daten aus Abbildung 3 liefert ein effektives Formalpotential E_{app} von $(-317 \pm 4) \text{ mV}$ und eine Anzahl transferierter Elektronen n von 0.6 ± 0.1 . Dieser kleine n -Wert (üblicherweise 1 für einen vollständig reversiblen Redoxübergang in einem *c*-Typ-Cytochrom) weist auf eine Verteilung von Redoxpotentialen an der Grenzfläche hin. Gestützt wird diese Hypothese durch

Voltammetriedaten, die auf zwei Redoxübergängen mit verschiedenen Formalpotentialen E_{f1} und E_{f2} hindeuten, deren arithmetisches Mittel mit E_{app} übereinstimmen. Obwohl die SERR-Spektren der beiden Redoxpaare identisch sind (es wurde nur sechsfach koordiniertes Bis(histidin)-ligiertes Häm beobachtet), können sie anhand ihres Formalpotentials unterschieden werden. Tatsächlich erzielt die Verwendung einer Nernst-Gleichung, die zwei Redoxübergänge statt einem berücksichtigt, eine ebenso gute Anpassung der experimentellen Daten (Abbildung SI5). Die daraus erhaltenen Potentialwerte $E_{f1} = (-295 \pm 2) \text{ mV}$ ($n = 0.9 \pm 0.1$) und $E_{f2} = (-367 \pm 7) \text{ mV}$ ($n = 0.8 \pm 0.2$) stimmen gut mit den CV-Daten überein, die bei niedrigen Potentialvorschubgeschwindigkeiten aufgenommen wurden.^[18]

In dieser ersten spektroelektrochemischen In-situ-SERR-Charakterisierung eines katalytisch aktiven Biofilms auf Silberelektroden konnten wir zeigen, dass zwei Bis(histidin)-koordinierte Cytochrome am DET zwischen Bakterien und Elektrode beteiligt sind. Die Tatsache, dass beide Redoxpaare spektroskopisch nicht unterscheidbar sind, legt die Schlussfolgerung nahe, dass geringe Strukturunterschiede – die nicht durch die hier analysierten SERR-Spektren wiedergegeben werden können – in der Kavität der Hämgruppe^[26,27] zu den verschiedenen Formalpotentialen E_{f1} und E_{f2} führen. Da weiterführende Strukturinformationen über OMCs dieser Bakterien fehlen, ist eine Zuordnung von E_{f1} und E_{f2} zu den Redoxübergängen spezifischer Hämgruppen a priori unmöglich. Tatsächlich könnten E_{f1} und E_{f2} individuelle, aber auch makroskopische Formalpotentiale widerspiegeln. Da allerdings der intramolekulare Elektronentransfer in Cytochromen unter Einschluss von Clustern aus Hämgruppen sehr schnell ist,^[28,29] ist es wahrscheinlich, dass E_{f1} und E_{f2} makroskopische Redoxpotentiale zweier verschiedener OMCs sind.

Der spektroskopische Beitrag beider OMCs zum SERR-Spektrum ist sehr ähnlich (Abbildung SI5), was die Schlussfolgerung nahelegt, dass den jeweiligen Cofaktoren im Wesentlichen die gleiche Oberflächenverstärkung ihres RR-Signals zuteil wird. Dies bedeutet, berücksichtigt man den starken Abfall der Oberflächenverstärkung mit steigendem Abstand,^[30] dass beide Cofaktoren eine ähnliche Distanz zur Elektrode haben. Dieser Schluss suggeriert, dass beide OMCs am direkten Elektronenaustausch mit der Elektrode beteiligt sind, was einem DET mit zwei parallelen Elektronentransferpfaden oder einem Elektronenrelais mit zwei parallelen Elektronenaustrittsstellen entspricht.

Ohne Zweifel sind weitere Studien und wesentlich mehr Daten über die Strukturen beteiligter OMCs erforderlich, um ein umfangreiches Verständnis des DET in Biofilmen zu erzielen. In diesem Zusammenhang ist der vorgestellte Ansatz einer Kombination von SERR-Spektroelektrochemie und Elektrochemie in der Lage, wichtige Beiträge auf diesem Gebiet zu leisten. Bisher stellt er die einzige In-situ-Methode dar, die es ermöglicht, Struktur und Funktion von OMCs in intakten Biofilmen zu studieren.

Eingegangen am 27. September 2010,
veränderte Fassung am 29. November 2010
Online veröffentlicht am 17. Februar 2011

Stichwörter: Cytochrome · Elektrochemie · Geobacter-Bakterien · Mikrobielle Brennstoffzellen · Raman-Spektroskopie

- [1] L. P. Nielsen, N. Risgaard-Petersen, H. Fossing, P. B. Christensen, M. Sayama, *Nature* **2010**, *463*, 1071.
- [2] K. Rabaey, L. Angenent, U. Schröder, J. Keller, *From Extracellular Electron Transfer to Biotechnological Application*, IWA, London, **2010**.
- [3] U. Schröder, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9*, 2619.
- [4] L. Shi, T. C. Squier, J. M. Zachara, J. K. Fredrickson, *Mol. Microbiol.* **2007**, *65*, 12.
- [5] T. Mehta, M. V. Coppi, S. E. Childers, D. R. Lovley, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 8634.
- [6] H. Richter, K. P. Nevin, H. F. Jia, D. A. Lowy, D. R. Lovley, L. M. Tender, *Energy Environ. Sci.* **2009**, *2*, 506.
- [7] C. Leang, X. L. Qian, T. Mester, D. R. Lovley, *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 4080.
- [8] K. P. Nevin, D. R. Lovley, *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 2248.
- [9] S. Srikanth, E. Marsili, M. C. Flickinger, D. R. Bond, *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *99*, 1065.
- [10] R. R. Pokkuluri, Y. Y. Londer, S. J. Wood, N. E. C. Duke, L. Morgado, C. A. Salgueiro, M. Schiffer, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2009**, *74*, 266.
- [11] K. Inoue, X. L. Qian, L. Morgado, B. C. Kim, T. Mester, M. Izallalen, C. A. Salgueiro, D. R. Lovley, *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 3999.
- [12] J. P. Busalmen, A. Esteve-Nunez, A. Berna, J. M. Feliu, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 4952; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4874.
- [13] A. Okamoto, R. Nakamura, K. Ishii, K. Hashimoto, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2329.
- [14] D. H. Murgida, P. Hildebrandt, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2005**, *7*, 3773.
- [15] D. Millo, A. Bonifacio, A. Ranieri, M. Borsari, C. Gooijer, G. van der Zwan, *Langmuir* **2007**, *23*, 9898.
- [16] S. Monari, A. Ranieri, G. Di Rocco, G. van der Zwan, S. Peresini, C. Tavagnacco, D. Millo, M. Borsari, *J. Appl. Electrochem.* **2009**, *39*, 2181.
- [17] S. A. Patil, F. Harnisch, B. Kapadnis, U. Schröder, *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 2167.
- [18] K. Fricke, F. Harnisch, U. Schröder, *Energy Environ. Sci.* **2008**, *1*, 144.
- [19] Y. Liu, F. Harnisch, K. Fricke, R. Sietmann, U. Schröder, *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *24*, 1006.
- [20] C. I. Torres, R. Krajmalnik-Brown, P. Parameswaran, A. K. Marcus, G. Wanger, Y. A. Gorby, B. E. Rittmann, *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43*, 9519.
- [21] F. Harnisch, C. Koch, S. A. Patil, T. Hübschmann, S. Müller, U. Schröder, *Energy Environ. Sci.* **2011**, DOI: 10.1039/c0ee00605j.
- [22] N. Law, S. Ansari, F. R. Livens, J. C. Renshaw, J. R. Lloyd, *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 7090.
- [23] S. A. Patil, F. Harnisch, U. Schröder, *ChemPhysChem* **2010**, *11*, 2834.
- [24] S. Oellerich, H. Wackerbarth, P. Hildebrandt, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 6566.
- [25] P. Hildebrandt, M. Stockburger, *Biochemistry* **1989**, *28*, 6710.
- [26] L. Morgado, A. R. Fernandes, Y. Y. Londer, P. R. Pokkuluri, M. Schiffer, C. A. Salgueiro, *Biochem. J.* **2009**, *420*, 485.
- [27] J. Petrović, R. A. Clark, H. J. Yue, D. H. Waldeck, E. F. Bowden, *Langmuir* **2005**, *21*, 6308.
- [28] C. M. Paquette, C. Reis, R. O. Louro, A. V. Xavier, T. Catarino, D. L. Turner, *Ann. Magn. Reson.* **2005**, *4*, 100.
- [29] F. Guerlesquin, M. Bruschi, K. Wuthrich, *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1985**, *830*, 296.
- [30] F. Siebert, P. Hildebrandt, *Vibrational Spectroscopy in Life Sciences*, Wiley-VCH, Weinheim, **2008**, S. 38–43.