

# Charakterisierung und Anwendung einer Biofilmkultivierungsplattform

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

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

genehmigte

DISSERTATION

von

**Tobias Kabbeck**

aus Achern

KIT-Dekan: Prof. Dr. Reinhard Fischer

Referent: Prof. Dr. Johannes Gescher

Korreferent: Prof. Dr. Christof Niemeyer

Tag der mündlichen Prüfung: 10.05.2019



Dieses Werk ist lizenziert unter einer Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz (CC BY 4.0): <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>

## **Erklärung an Eides statt**

Hiermit erkläre ich, dass ich die folgende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Alle Teile, die wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommen sind, sind von mir durch Angabe der Quelle als Entlehnung gekennzeichnet. Weiterhin habe ich beim Anfertigen dieser Arbeit die Regeln zur Sicherung der guten wissenschaftlichen Praxis des KITs beachtet und alle Primärdaten gemäß Abs. A (6) am Institut archiviert. Des Weiteren versichere ich, dass die elektronische mit der schriftlichen Form dieser Arbeit übereinstimmt.

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Februar 2015 bis März 2019 am Institut für Biologische Grenzflächen 1 der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften des Karlsruher Instituts für Technologie unter der Leitung von Professor Dr. Johannes Gescher durchgeführt.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

# Publikationen

## Fachzeitschriften

- 2017 S. H. Hansen, T. Kabbeck, C. P. Radtke, S. Krause, E. Krolitzki, T. Peschke, J. Gasmi, K. S. Rabe, M. Wagner, H. Horn, J. Hubbuch, J. Gescher, C. M. Niemeyer (2017) Machine-assisted cultivation and analysis of biofilms. *bioRxiv* 210583
- 2014 K. Dolch, J. Danzer, T. Kabbeck, B. Bierer, J. Erben, A. H. Förster, J. Maisch, P. Nick, S. Kerzenmacher & J. Gescher (2014) Characterization of microbial current production as a function of microbe-electrode-interaction. *Bioresour. Technol.*, 157: 284-292.

## Konferenzbeiträge

- 08/2018 Vortrag; 17th International Symposium on Microbial Ecology (ISME17), Leipzig (Germany)  
**Titel:** Robot-assisted microfluidic cultivation of multispecies biofilms
- 04/2018 Posterpräsentation; Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (2018), Wolfsburg (Germany)  
**Titel:** Multispecies biofilm formation: Application of a novel cultivation device

## **Zusammenfassung**

Biofilme sind sessile, in eine Matrix eingebettete, mikrobielle Gemeinschaften und stellen die primäre Lebensform von Mikroorganismen dar. Sie haben großen Einfluss auf wichtige Aspekte der Medizin und Industrie und zeigen ein enormes Potential in der Erforschung sozialer mikrobiologischer Interaktionen. Die Analyse dieser komplexen Systeme erweitert unser Verständnis mikrobiellen Lebens beständig, bedingt allerdings auch die stetige Entwicklung und Optimierung neuer Technologien zur Biofilmkultivierung und -analyse.

In dieser Arbeit wurde, mit dem Hintergrund der Co-Kultivierung bisher unkultivierbarer Mikroorganismen, ein neuentwickeltes mikrofluidisches Chipsystem auf dessen Anwendbarkeit als Biofilmkultivierungsplattform untersucht. Eine der Kernideen des Systems war dabei die Separierung von Biofilmgemeinschaften über den Verlauf des fluidischen Kanals. Die Möglichkeit mikrobiologische Co-Kulturen räumlich aufzutrennen dient als eine der Grundvoraussetzungen für die Anreicherung und Analyse bisher unkultivierbarer Mikroorganismen. Aus diesem Grund war ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit biologische Gradienten innerhalb des fluidischen Systems zu generieren und nachzuweisen. Die Charakterisierung umfasste zudem die Kontrolle der allgemeinen und gerichteten Biofilmkultivierung, die Validierung speziell angepasster Methoden sowie den Nachweis als potentielle Mutagenese- und Screeningplattform.

Im Allgemeinen ergab sich durch verbesserte Prozessprotokolle und der Entkopplung händischer Analysen eine gesteigerte Reproduzierbarkeit durchgeführter Biofilmkultivierungen. Das System wurde im Verlauf der Systemoptimierung um eine Infrastruktur zur parallelen und anoxischen Kultivierung erweitert. Robotergestützte Analysen ermöglichten es auf die Anwendung molekularbiologisch modifizierter Modellorganismen, wie autofluoreszente Stämme, prinzipiell zu verzichten. Anhand der Kultivierung und Analyse von 2-Spezies-Konsortien konnte die angestrebte zweidimensionale Auftrennung über den Verlauf des Systems, sowohl für prozessbedingte als auch biologisch generierter Gradienten, nachgewiesen werden. Zudem wurde erstmals und erfolgreich die Kombination aus robotergestützter Probenahme und 16S-rDNA Amplicon Sequenzierung dazu genutzt die räumliche Auftrennung zweier Co-kultivierter Spezies innerhalb des Chipsystems aufzuzeigen.

Durch Experimente mit UV-C Strahlung zur nicht invasiven Biofilmmanipulation konnte das System als Mutagenese-Plattform etabliert werden. Des Weiteren konnte dank der Modellierbarkeit des Systems ein speziell angepasstes Setup zur konstanten Generierung neuer

Stammvarianten entwickelt werden. Als *Proof of Concept* wurde auf Stämme mit einer erhöhten Toleranz gegenüber dem Elektronenmediator Methylenblau selektiert, welche zur Optimierung bioelektrochemischer Systeme eingesetzt werden sollten. Mit dem Setup konnten erfolgreich neue methylenblautolerantere Varianten des Stammes JG806 generiert werden. Eine genauere Analyse neuer Stammvarianten zeigte eine erhöhte Stromproduktion in bioelektrochemischen Systemen und unter anderem eine Mutation im Repressor AcrR als mögliche Ursache für die vielfach erhöhte Toleranz gegenüber Methylenblau.

## Abkürzungsverzeichnis

AHT	Anhydrotetracyclin
bp	Basenpaar
Cr(VI)	sechswertiges Chrom
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH <sub>2</sub> O	doppelt-destilliertes Wasser (Reinstwasser)
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
FA	Formamid
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
LHS	<i>Liquid Handling Station</i>
NGS	<i>next generation sequencing</i>
NHE	Normal-Wasserstoffelektrode
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
OD <sub>850</sub>	optische Dichte bei 850 nm
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
rpm	<i>rounds per minute</i>
STC	<i>small tetraheme cytochrome</i>
VBNC	<i>viable-but-nonculturable</i>

# Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Zusammensetzung von Biofilmen.....	4
Abb. 2: Schematische Darstellung chemischer und physiologischer Heterogenität in Biofilmen.....	9
Abb. 3: Co-Kultivierung bisher unkultivierbarer Mikroorganismen. ....	11
Abb. 4: Biofilmkultivierungsstrategien.....	13
Abb. 5: Darstellung exemplarischer fluidischer/mikrofluidischer Biofilmkultivierungssysteme. ....	14
Abb. 6: Schematische Darstellung der verlängerten Atmungskette eines synthetisch exoelektrogenen <i>E. coli</i> -Stammes. ....	16
Abb. 7: Schematische Darstellungen der Chip- und Kanalgeometrie.....	24
Abb. 8: Aufnahme einer Gussform mit Negativ der mikrofluidischen Kanalstruktur.....	25
Abb. 9: Neuentwickelte Begasungskammer zur anoxischen Biofilmkultivierung. ....	26
Abb. 10: Schematische Darstellung der Standardkonnektierung des mikrofluidischen Chips.....	27
Abb. 11: Schematische Darstellung und Fließschema des Gesamtsystems.....	28
Abb. 12: Stufensystem zur Positionierung von Begasungskammern. ....	29
Abb. 13: Grundelemente der automatisierten FISH.....	31
Abb. 14: Robotergestützte Probenentnahme. ....	34
Abb. 15: Darstellung angepasster Chipgeometrie.....	35
Abb. 16: Schematische Darstellung des erweiterten Aufbaus zur Generierung methylenblautoleranter Stämme.....	46
Abb. 17: Exemplarische Darstellung mikroskopischer Analyse eines mikrofluidischen Chips. ....	54
Abb. 18: Abbildung des Mutagenese-Systems mit UV-Lampe und einstellbarer Halterung. .	55
Abb. 19: Schematische Darstellung des Wirkungsbereichs der UV-Lampe.....	56
Abb. 20: Technische Zeichnung verwendeter bioelektrochemischer Reaktorsysteme.....	60
Abb. 21: Zeitliche Aufnahmen verschiedener Chipsektionen eines mit <i>Micrococcus luteus</i> kultivierten Chips. ....	63
Abb. 22: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen aus einem mit <i>M. luteus</i> kultiviertem Chip.....	64
Abb. 23: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen aus <i>M. luteus</i> / <i>P. brassicacearum</i> Co-Kulturrexperimenten.....	67

Abb. 24: Graphische Darstellung des Wachstumsverhalten von <i>E. coli</i> K12 in Anwesenheit von Chrom(VI).....	69
Abb. 25: Aufnahmen aus mit <i>E. coli</i> kultivierten Chips unter Chromstress.....	70
Abb. 26: Aufnahmen des Aufbaus des <i>E. coli</i> / <i>L. chromiirestiens</i> Co-Kultorexperiments...	71
Abb. 27: Darstellung des Spezies-Verhältnisses vorderer und hinterer Bereiche Co-kultivierter Chips unter Einfluss unterschiedlicher Chrom(VI)-Konzentrationen.....	73
Abb. 28: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen aus Regionen der in Abb. 27 aufgezeigten Probenahme.....	74
Abb. 29: Darstellung beispielhafter Heatmaps aus der Absorptionsmessung von Chips (A) ohne und mit (B) 20,7 mJ/cm <sup>2</sup> beziehungsweise (C) 41,4 mJ/cm <sup>2</sup> Bestrahlung.....	77
Abb. 30: Graphische Darstellung mittlerer Zellzahlen mehrerer UV-C bestrahlter Chips und nicht bestrahlter Kontrolle.....	78
Abb. 31: Darstellung des Aufbaus der Selektionsplattform bestehend aus drei Chips, inklusive skizzierten Fließschema. ....	80
Abb. 32: Einzelner Chip des Zuchtsetups zur Optimierung der Methylenblautoleranz von JG806 und beispielhafte LB/Methylenblau-Platte zur Anzucht entnommener Proben. ....	81
Abb. 33: Wachstumsverhalten des Ausgangsstammes JG806 sowie der neuen Stammvarianten F2 und C8 mit und ohne Methylenblau. ....	83
Abb. 34: Exemplarische Aufnahmen aus den ersten 10 h der Wachstumsexperimente ohne und mit 400 µM bzw. 1200 µM Methylenblau. ....	84
Abb. 35: Ergebnis des Assays zur Reduktionskinetik von Methylenblau. ....	86
Abb. 36: Verlauf der Stromproduktion des Ausgangsstammes JG806 (grau) und der Stammvariante F2 (blau) in einer mikrobiellen Brennstoffzelle.....	89
Abb. 37: Positionierungsschema verwendeter Module zur Durchführung automatisierter FISH. ....	126
Abb. 38: Agarosegel der Test-PCR zur direkten Amplifizierung aus kleinen Probenvolumina mit Schwermetallanteil.....	126
Abb. 39: Kontrollgel nach der Adapter-Amplifikation zur Vorbereitung von 16S-rDNA Amplicon Sequenzierungen. ....	127
Abb. 40: Gelbilder zur Transformationskontrolle zum Ziel der Stammkomplementierung mit pEC86 und pBAD-STC.....	127
Abb. 41: Zusammengesetzte Aufnahme eines <i>L. chromiirestiens</i> -Streamer.....	128
Abb. 42: Aufnahmen aus den Wachstumsversuchen mit der Stammvariante F2 und 1200 µM Methylenblau.....	128

# Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Protokoll der Sauerstoffplasmabehandlung. ....	25
Tab. 2: Auflistung verwendeter Sonden für die FISH. ....	32
Tab. 3: Zusammensetzung des Hybridisierungspuffers. ....	32
Tab. 4: Zusammensetzung des verwendeten Waschpuffers zur Entfernung ungebundener FISH-Sonden. ....	32
Tab. 5: Verwendetes Protokoll automatisierter FISH. ....	33
Tab. 6: Zusammensetzung des 20fachen SSC-Stocks. ....	33
Tab. 7: Zusammensetzung des 10fachen PBS-Stocks. ....	33
Tab. 8: Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Stämme. ....	37
Tab. 9: Zusammensetzung des LB( <i>lysogeny broth</i> )-Mediums. ....	38
Tab. 10: Zusammensetzung von „10%igem LB“ ....	38
Tab. 11: LB-Medium mit Chromat. ....	39
Tab. 12: Zusammensetzung des K(Batch)-Mediums. ....	39
Tab. 13: Methylenblau-Medium für Wachstumsversuche. ....	40
Tab. 14: Zusammensetzung des MFC-Mediums. ....	40
Tab. 15: Zusammensetzung des K(Chemostat)-Mediums (Variante 1). ....	41
Tab. 16: Zusammensetzung des K(Chemostat)-Mediums (Variante 2). ....	41
Tab. 17: Zusammensetzung des Methylenblau-Minimalmediums für Chipkultivierungen. ...	42
Tab. 18: Zusammensetzung Spurenelementlösung MFC. ....	42
Tab. 19: Zusammensetzung SL10 (1000x). ....	43
Tab. 20: Zusammensetzung M9-Salze (5x). ....	43
Tab. 21: Zusammensetzung Salz-Lösung (10x). ....	43
Tab. 22: Zusammensetzung des Methylenblau-Stocks. ....	43
Tab. 23: Auflistung aller experimentspezifischen Varianten fluidischer Chipkultivierungen. ....	45
Tab. 24: Plattenschema (96-Wellplatte) für das Vorscreening auf Methylenblautoleranz neuer Stammvarianten aus Stammentwicklungsexperimenten mit JG806. ....	48
Tab. 25: Auflistung in dieser Arbeit verwendeter Plasmide. ....	49
Tab. 26: Einfacher Reaktionsansatz MangoMix. ....	50
Tab. 27: Einfacher Reaktionsansatz HiFi-Polymerase. ....	50
Tab. 28: Liste verwendeter Primer. ....	50
Tab. 29: Programmierte Parameter relevanter PCR-Reaktionen. ....	51

Tab. 30: Zusammensetzung des 50fachen TAE-Puffer.....	51
Tab. 31: Zusammensetzung des 6fachen Ladepuffers. ....	52
Tab. 32: Zusammensetzung des Adaptionmedium (Reduktionsassay). ....	59
Tab. 33: Zusammensetzung der Testlösung (Reduktionsassay). ....	59
Tab. 34: Auflistung maximaler optischer Dichten und Steigungen aus Vorversuchen zur Methylenblautoleranz.....	81
Tab. 35: Ergebnis der Variantenanalyse beider Stämme. ....	87
Tab. 36: Tabellarische Darstellung des produzierten Stroms. ....	88
Tab. 37: Positionierung und Volumina vorzubereitender Lösungen für die automatisierte FISH. ....	125

# Inhalt

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Biofilme .....	1
1.2 Interaktion in Biofilmen .....	6
1.2.1 Kommunikation, Kooperation und Konkurrenz .....	6
1.2.2 Ausbildung von Gradienten und Subpopulationen .....	8
1.2.3 Abhängigkeiten in Co-Kultur .....	10
1.3 Biofilmkultivierungsstrategien .....	12
1.4 Biofilme in bioelektrochemischen Systemen .....	15
1.5 Modellstämme in Co-Kultur Systemen .....	18
1.6 Zielsetzung.....	21
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>23</b>
2.1 Chipsystem zur Kultivierung von Biofilmen.....	23
2.1.1 Verwendetes Chipdesign .....	23
2.1.2 Fabrikation der Chips .....	24
2.1.3 Kammer für anaerobe Kultivierungen .....	26
2.1.4 Gesamtsetup und unterstützende Infrastruktur .....	26
2.2 Analyse fluidischer Chips.....	30
2.2.1 Automatisierte Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung .....	30
2.2.2 Robotergestützte Probenahme .....	34
2.2.3 Gesamtkanal-Absorptionsmessung .....	35
2.3 Verwendete Stämme.....	37
2.4 Verwendete Chemikalien und Kultivierungsmedien.....	38
2.5 Allgemeine Kultivierungsarbeiten und Handhabung des Chipsystems .....	44
2.5.1 Stammhaltung und Kryokonservierung .....	44
2.5.2 Vorkulturen .....	44
2.5.3 Inokulation und Kultivierung mikrofluidischer Chips.....	44
2.5.4 Setup-Varianten.....	46

2.5.5 Chromtoleranztest (96-Well).....	46
2.5.6 Vorscreening Methylenblauexperiment.....	47
2.5.7 Wachstumsversuche (Methylenblautoleranz).....	48
<b>2.6 Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>49</b>
2.6.1 DNA-Extraktion genomischer DNA .....	49
2.6.2 Isolation von Plasmiden .....	49
2.6.3 Polymerase-Kettenreaktion .....	49
2.6.4 Agarose Gelelektrophorese .....	51
2.6.5 Aufreinigung von PCR-Produkten .....	52
2.6.6 Quantifizierung von DNA .....	52
2.6.7 Transformation .....	52
2.6.8 Sequenzierung und bioinformatische Analyse .....	53
<b>2.7 Mikroskopische Analysen .....</b>	<b>54</b>
<b>2.8 UV-Mutagenese.....</b>	<b>55</b>
<b>2.9 Reduktionsassay (96-Well).....</b>	<b>58</b>
<b>2.10 Bioelektrochemische Systeme .....</b>	<b>60</b>
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>62</b>
3.1 Allgemeine Beschreibung des Systems .....	62
3.2 Sauerstoff-bedingte Nischenbesetzung.....	65
3.3 Toxizitäts-bedingte Auftrennung.....	68
3.3.1 Vorexperimente zur Chrom(VI)-Toleranz von <i>E. coli</i> K12.....	68
3.3.2 Co-Kulturexperimente mit Chrom(VI).....	70
3.4 Einfluss von UV-C Strahlung auf die Biofilmbildung.....	76
3.5 Stammentwicklung mit Hilfe des mikrofluidischen Chipsystems .....	79
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>90</b>
4.1 Charakterisierte Biofilmbildung innerhalb des fluidischen Systems .....	91
4.2 Gezielt Separierung über den Verlauf der Mikrofluidik .....	94
4.3 UV-C Strahlung zur nicht invasiven Biofilmmanipulation .....	100
4.4 Stammoptimierung durch fluidische Biofilmkultivierung .....	102

4.5 Ausblick.....	107
<b>5. Referenzen.....</b>	<b>109</b>
<b>6. Anhang .....</b>	<b>125</b>
6.1 Ergänzung Material und Methoden .....	125
6.2 Ergänzende Ergebnisse .....	126
6.3 Technische Zeichnungen .....	129
<b>Danksagung.....</b>	<b>133</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Biofilme

Vor 40 Jahren brachten Bill Costerton und Kollegen das erste Mal die Bedeutung sessiler Mikroorganismen in den Fokus wissenschaftlicher Interessen (Costerton *et al.*, 1978), wodurch sich unsere Vorstellung mikrobiologischen Lebens grundlegend änderte. Seit damals wurde es nach und nach zum allgemein anerkannten Verständnis, dass native mikrobiologische Systeme nicht aus planktonischen Reinkulturen bestehen, sondern sich diese meist aus fixierten polymikrobiellen Gemeinschaften, sogenannten Biofilmen, zusammensetzen.

Biofilme sind definiert als Aggregate von Mikroorganismen, eingebettet in eine selbstproduzierte Matrix extrazellulärer polymerer Substanzen (EPS), in welchen die Zellen aneinander oder an Oberflächen adhärirt sind (Vert *et al.*, 2012). Als hauptsächliche Lebensform von Mikroorganismen sind Biofilme ubiquitär verbreitet und können aus einer Vielzahl unterschiedlichster Spezies bestehen (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Sie bilden sich nicht nur auf festen Oberflächen aus, sondern sind auch in Grenzschichten zwischen gasförmigen und flüssigen Medien (Spiers *et al.*, 2003) sowie in der Phasengrenze unterschiedlicher Flüssigkeiten (Vaysse *et al.*, 2011) vorzufinden.

Biofilme nehmen wichtige Funktionen im Mikrobiom mehrzelliger Lebewesen (D'Argenio and Salvatore, 2015; Kim *et al.*, 2018) ein, sind allerdings auch bekannt für ihre Rolle bei chronischen Infektionen, wie z.B. im Falle chronischer Mittelohrentzündung oder bei Patienten mit Mukoviszidose (Burmølle *et al.*, 2010). Ebenso kontrovers verhalten sich technisch und industriell relevante Aspekte dieser mikrobiellen Gemeinschaften. So stehen sie unter anderem in Bezug zu Korrosion (Beech and Sunner, 2004) und Kontamination industrieller Prozesse (Simões *et al.*, 2010; González-Rivas *et al.*, 2018), erfüllen auf der anderen Seite essentielle Aufgaben in der Aufbereitung von Abwasser (Lazarova and Manem, 1995; Sheng *et al.*, 2010) und dienen der biotechnologischen Darstellung von Fein- und Basischemikalien (Halan *et al.*, 2012). Nicht zuletzt stellen diese polymikrobiellen Gemeinschaften einen elementaren Bestandteil sowohl globaler als auch lokaler geochemischer Kreisläufe dar (Battin *et al.*, 2003; Ziegler *et al.*, 2013; Meckenstock *et al.*, 2015).

Die genauen Bestandteile eines Biofilms unterscheiden sich abhängig von der Zusammensetzung des Konsortiums und den Wachstumsbedingungen (Breugelmans *et al.*, 2008). Mit bis zu 97% ist die Hauptkomponente in den meisten Fällen Wasser (Spiers *et al.*,

2003), welches dem Biofilm einen gelartigen Charakter verleiht (Flemming and Wingender, 2010). Betrachtet man die Trockenmasse besteht diese wiederum zu 75-90% aus EPS womit die Zellen einen mengenmäßig kleinen Teil der Gesamtmasse eines Biofilms ausmachen (Costerton, 1999). Trotzdem ergibt sich für Biofilme meist eine signifikant höhere Zelldichte als für planktonisch lebende Organismen des gleichen Habitats (Morgan-Sagastume *et al.*, 2008; Balzer *et al.*, 2010).

Die Bildung eines Biofilms ist ein stufenweiser Prozess (s. auch Abb. 1(A)) und startet mit der reversiblen Anlagerung planktonischer Zellen an eine Oberfläche (Sauer *et al.*, 2002; Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Vorausgehend ist die Ausbildung eines Konditionierungsfilms (*conditioning film* (Vert *et al.*, 2012)), welcher sich aus angelagerten organischen Substanzen des umgebenden Mediums zusammensetzt (Loeb and Neihof, 1975; Costerton *et al.*, 1987; Jain and Bhosle, 2009). Diese Beschichtung dient als weitere Grundlage der Zellinteraktion und es kommt zu Spezies-spezifischer Erkennung von Oberflächen sowie der unspezifischen Ablösung von Zellen (Costerton, 1999; Karatan and Watnick, 2009; Chagnot *et al.*, 2013). Im nächsten Schritt der Biofilmbildung erfolgt die stabile Adhäsion der Mikroorganismen mit und durch die Umstellung der Proteinsynthese, was unter anderem zur Intensivierung der Oberflächeninteraktion und der Ausbildung einer extrazellulären Matrix führt. Die Adaption auf eine sessile Wuchsform stellt einen deutlichen Unterschied zum planktonischen Phänotyp dar und geht mit einer stark veränderten Regulation von bis zu 50% des Proteoms einher (Costerton, 1999; Sauer *et al.*, 2002). Durch das fortschreitende Zellwachstum entstehen Mikrokolonien, welche bereits separat umschlossene Gemeinschaften einer oder mehrerer Spezies darstellen können. Diese Biofilm-Grundeinheiten bilden sich weiter aus und formen dabei den adulten Biofilm. Die entstehenden Strukturen zeigen eine breite architektonische Vielfalt, wie die Ausbildung pilzartiger Makrokolonien (Klausen *et al.*, 2003) oder Netzwerke definierter Versorgungskanäle für den Massetransport (de Beer *et al.*, 1994; Wilking *et al.*, 2013). Biofilmbildung gipfelt dabei unter anderem in makroskopisch sichtbaren Streamern, Matten- und Stalaktit-artigen Biofilmen sowie den biologischen Bestandteilen von Stromatolithen oder glockenförmigen Höhlenmineralien (Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Ziegler *et al.*, 2009; Drescher *et al.*, 2013; Stinnesbeck *et al.*, 2018). Die finale Zusammensetzung unterscheidet sich dabei abhängig von den jeweiligen Wachstumsbedingungen und der Diversität des Konsortiums (Breugelmans *et al.*, 2008). Die letzte Stufe der Biofilmentwicklung ist geprägt durch die aktive und passive Ausbreitung der Zellen des Biofilms. Dies geschieht unter anderem durch die partielle Freisetzung von Zellen, inklusive einer Wiederaufnahme des planktonischen Phänotyps (Sauer *et al.*, 2002), oder durch eine Abtrennung ganzer

Zellaggregate (Stoodley *et al.*, 2001). Aktive Zellablösung kann dabei beispielweise durch Nährstoffmangel ausgelöst werden (Hunt *et al.*, 2004).

Neben Biofilmen haben sich im Laufe der Evolution weitere Formen multizellulärer mikrobieller Lebensformen ausgebildet. Dazu gehören filamentöse Cyanobakterien, Fruchtkörper von Myxobakterien oder das Mycel von Pilzen und Streptomyceten (Claessen *et al.*, 2014). Eine wichtige Charakteristik von Biofilmen, im Vergleich zu anderen multizellulären Strukturen, liegt in der Ausbildung einer Matrix extrazellulärer polymerer Substanzen. Diese EPS sind mindestens zu Teilen von den Organismen selbst produziert und bestehen aus Polysacchariden, Nukleinsäuren, Proteinen und Lipiden (s. auch Abb. 1(B) und (C)) (Flemming and Wingender, 2010).

Auch als „Haus der Mikroorganismen“ beschrieben (Flemming *et al.*, 2007) vermittelt die Matrix dem Biofilm eine Reihe ergänzender Eigenschaften, welche durch das Studium rein planktonisch lebender Bakterien und Archaea nicht zu erraten ist (Flemming *et al.*, 2016). Einige der wichtigsten Eigenschaften betreffen den Schutz und die Stabilität der umhüllten Mikroorganismen. So bietet die Bildung hygroskopischer Substanzen, z.B. hydrophile Polysaccharide und Proteine, den Mikroorganismen eine stark hydrierte Umgebung (Flemming and Wingender, 2010). Diese bedingte Toleranz gegenüber Austrocknung verschafft Zellen innerhalb eines Biofilms, vor allem bei Fluktuationen des Wasserpotentials, einen wichtigen Vorteil im Vergleich zu freilebenden Bakterien und Archaea (Roberson and Firestone, 1992; Potts, 1994).

Die Matrix ermöglicht die unspezifische Sorption und Konzentration von Substanzen des Biofilmumfeldes. Dies beinhaltet die Absorption von Stoffen in der wässrigen Phase eines Biofilms wie auch die Adsorption an polymere Substanzen und Zellen (Flemming and Wingender, 2010). Nach diesem Prinzip erfolgt auch die Rückhaltung interner Ressourcen innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaft, wie produzierter extrazellulärer Enzyme oder den Resten lysierter Zellen (s. auch Abb. 1(D)). Neben der externen Zufuhr und diesem geförderten Recycling durch Akkumulation können die polymeren Substanzen der Matrix selbst auch als Substrat für die Versorgung der Mikroorganismen dienen (Freeman and Lock, 1995; Decho *et al.*, 2005; Flemming and Wingender, 2010).

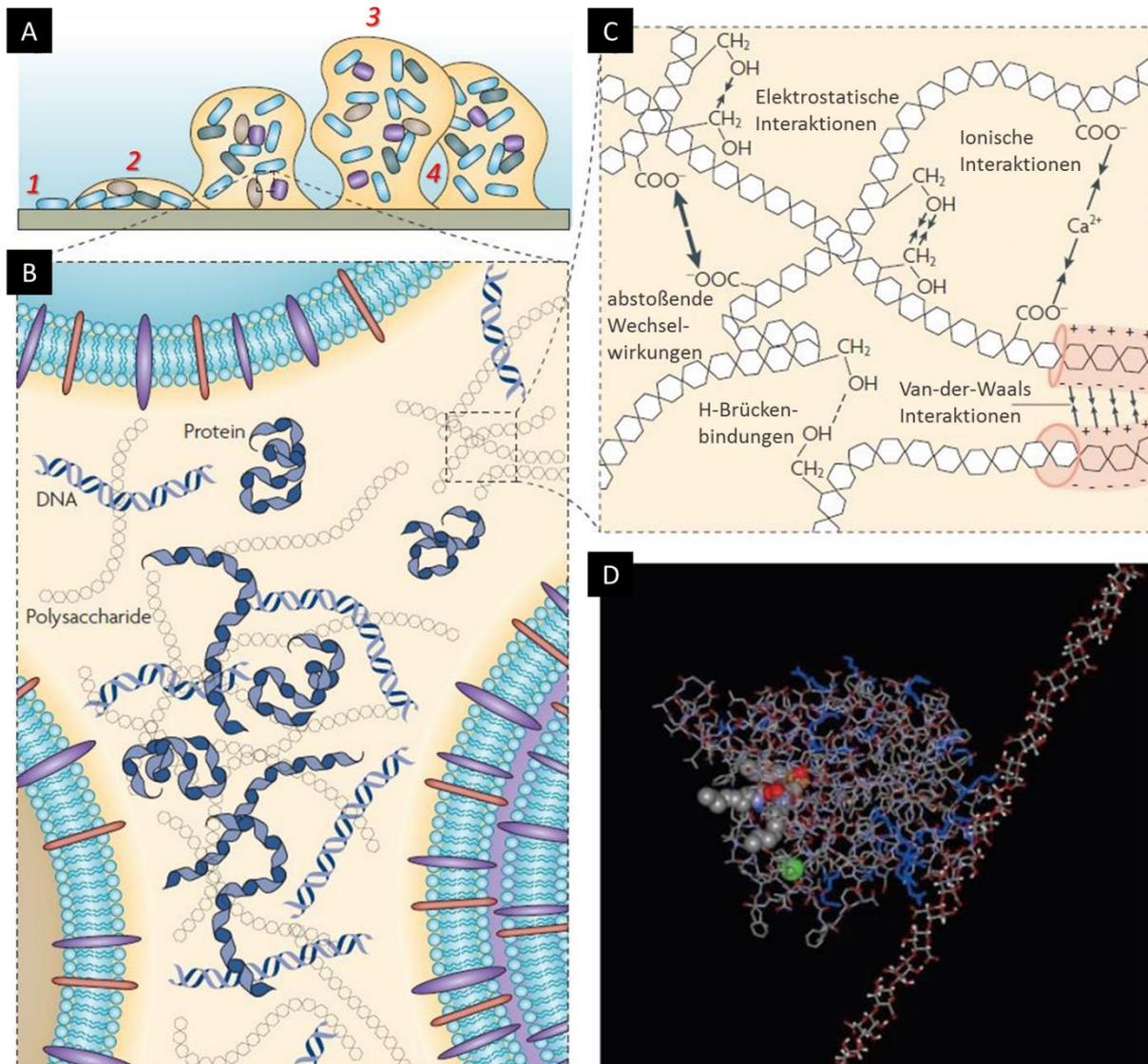


Abb. 1: Zusammensetzung von Biofilmen. (A) Schematische Entwicklung und Architektur von Biofilmen. In Rot: 1 = reversible Anlagerung planktonischer Zellen; 2 = irreversible Anlagerung sowie Ausbildung der Matrix und Bildung von Mikrokolonien inklusive des Einschusses artfremder Zellen; 3 = adulter Biofilm mit matrixgestützter Architektur; 4 = Kanalstrukturen für den Massetransport. (B) Die häufigsten polymeren Bestandteile der Matrix und (C) deren physikalisch-chemischen Wechselwirkungen. (D) Simulation einer Enzym-Polymer-Interaktion als Beispiel einer aktivierten Matrixkomponente. Abbildung modifiziert nach Flemming and Wingender (2010).

Eine der Hauptaufgaben der Matrix liegt in der Gewährleistung mechanischer Stabilität, welche auch die zuvor beschriebene Ausbildung komplexer Architekturen ermöglicht. Biofilme verhalten sich wie viskoelastische Fluide und werden in ihrer Entwicklung stark von Scherkräften beeinflusst (Stoodley *et al.*, 2002; Blauert *et al.*, 2015). Dabei folgt aus einem höherem Scherstress in der Entwicklungsphase ein stabilerer Biofilm mit stärkerer Haftung und Matrix. Auch ergibt sich ein dynamischer Schutz durch eine Zunahme der Stabilität nach

spontanem Scherstress oder Biozid-Behandlung (Simões *et al.*, 2005; Peck *et al.*, 2018). In der Ausbildung multizellulärer, dreidimensionaler Strukturen zeigt sich auch ein wichtiger Schutz vor der Abgrasung durch räuberische Protozoen (Matz and Kjelleberg, 2005).

Eine der bekanntesten und medizinisch herausforderndsten Biofilmeigenschaften ist die vielfach erhöhte Toleranz gegenüber antimikrobiellen Substanzen (Stewart and Costerton, 2001; Fux *et al.*, 2005). Diese ergibt sich aus einem Zusammenspiel vieler verschiedener Faktoren. Zum einen erfolgt durch extrazelluläre Reaktionen mit polymeren Substanzen (Daddi Oubekka *et al.*, 2012; Chiang *et al.*, 2013) und dem aktiven enzymatischem Abbau (Bagge *et al.*, 2004) eine Matrix-bedingte Inhibierung oder Inaktivierung antimikrobieller Wirkstoffe (Olsen, 2015). Parallel ergibt sich eine verringerte Wirkungsmöglichkeit vieler Antibiotika durch das Vorkommen dormanter Zellstadien und reduzierter Stoffwechselprozesse (Lewis, 2007). Zusätzlich werden auch nicht-Biofilm spezifische Resistenzmechanismen wie die Ausbildung von Effluxpumpen und Modifikationen Antibiotika-relevanter Bindestellen betrieben (Walsh, 2000).

## 1.2 Interaktion in Biofilmen

Aufgrund der räumlichen Nähe der Zellen einer Biofilmpopulation kommt es zu einer Vielzahl sozialer Interaktionen einzelner Mikroorganismen. Diese Interaktionen können sehr komplexe Ausmaße annehmen und umfassen verschiedene Aspekte der Kommunikation, Kooperation und Konkurrenz (Nadell *et al.*, 2016; Flemming *et al.*, 2016).

### 1.2.1 Kommunikation, Kooperation und Konkurrenz

Kommunikation innerhalb eines Biofilms verläuft neben direktem Zell-Zell-Kontakt besonders durch das sogenannte Quorum sensing (Davies *et al.*, 1998; Waters and Bassler, 2005). Hierbei betreibt jede Zelle die Freisetzung und Detektion kleiner Signalmoleküle, sogenannter Autoinduktoren. Überschreitet die gemeinschaftlich produzierte Konzentration eines Autoinduktors einen definierten Schwellenwert startet eine Signalkaskade, welche zu einer entsprechenden Veränderung der Genexpression führt. Beispiele umfassen die Antibiotikaproduktion (Thomson *et al.*, 2000) oder Biolumineszenz in Leuchtorganen von Tiefseefischen (Visick *et al.*, 2000). Quorum sensing hat einen artübergreifenden Einfluss auf mikrobielle Gemeinschaften und kann zu solch massiven Veränderungen innerhalb einer Population führen, dass aus der Inhibierungen dieser Signalkaskaden, auch Quorum quenching genannt, bereits ein prominenter Ansatz zur Behandlung multiresistenter Biofilme wurde (Kalia, 2013).

Neben den bereits beschriebenen Schutzeigenschaften der Matrix bietet das Leben innerhalb eines Biofilms weitere, oft im Zusammenhang mit anderen Mikroorganismen etablierte, Vorteile. So werden innerhalb der Matrix nicht nur Stoffe aus dem umliegenden Medium akkumuliert, sondern es werden auch von Zellen sekretierte Exoenzyme zurückgehalten (Tielen *et al.*, 2013). Daraus resultiert eine deutlich effizientere Nutzung der Enzyme als im Falle planktonischer Lebensweise, da es durch eine Abgabe in wässriger Lösung schnell zu einer Verdünnung der Proteine kommt. Innerhalb eines Biofilms interagieren die Proteine mit den polymeren Substanzen und generieren eine sogenannte aktivierte Matrix, was praktisch einem zellexternen Verdauungssystem mikrobieller Aggregate entspricht (Flemming *et al.*, 2016). Bedenkt man die aufkommende Diversität in Biofilmen resultiert daraus eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine deren enzymatische Aktivitäten innerhalb der Gemeinschaft geteilt wird. Dies führt zu einer Erweiterung des nutzbaren Substratspektrums oder der Verlängerung interner Nahrungsketten. In manchen Fällen kann die gemeinschaftliche Arbeitsteilung mehrerer Spezies auch zu einem effizienteren Abbau toxischer Substanzen führen. Ein Beispiel

dafür ist die synergistische Zersetzung des Herbizides Linuron (Breugelmans *et al.*, 2008). Im Sinne des kooperativen Metabolismus ist auch das Zusammenspiel von Ammonium- und Nitrat-oxidierenden Bakterien im Prozess der Nitrifikation zu erwähnen, welches ebenfalls durch die räumliche Nähe beider Parteien ermöglicht wird (Schramm *et al.*, 1996).

Die Teilung von Gemeinschaftsgütern beschränkt sich nicht nur auf extrazelluläre Enzyme, sondern betrifft auch die Sekretion von Nährstoff-Chelatoren wie Siderophore zur Bindung und Konzentrierung gelöster Eisenspezies (Griffin *et al.*, 2004; Visca *et al.*, 2007), Adhäsine (Absalon *et al.*, 2011), Signalmoleküle (Hammer and Bassler, 2003; Williams, 2007), Metabolite des Stoffwechsels (Zelezniak *et al.*, 2015) und strukturelle Polymere der Biofilmmatrix (Flemming and Wingender, 2010). Da nicht alle Organismen in der Lage sind EPS auszubilden, stellt besonders der letzte Punkt eine grundlegende Komponente sozialer Interaktion mikrobieller Gemeinschaften dar. Ein weiterer Vorteil räumlicher Nähe zeigt sich in einem vermehrten heterologen Gentransfer innerhalb von Biofilmen (Hausner and Wuertz, 1999; Molin and Tolker-Nielsen, 2003). Dies wird neben der kurzen Distanz zwischen den Organismen und einer erhöhten Konjugations- und Transformationseffizienz auch durch den Rückhalt genetischen Materials durch die Biofilmmatrix unterstützt (Chiang *et al.*, 2013).

Speziesinteraktionen innerhalb eines Biofilms beruhen nicht allein auf kooperativen Effekten. Platz und die Verfügbarkeit von Substraten sind limitiert (Hibbing *et al.*, 2010). Gerichtetes konkurrierendes Verhalten drückt sich unter anderem durch die Bildung antimikrobieller Verbindungen wie Colicine und Bacteriocine (proteinbasierte Toxine) sowie der Unterdrückung der Biofilmbildung, dem Abbau der Matrix und der Initialisierung der Biofilmauflösung konkurrierender Spezies aus (Rendueles and Ghigo, 2015). Antagonistische Produkte finden dabei Unterstützung durch den Einsatz des Typ-VI-Sekretionssystems (MacIntyre *et al.*, 2010). Eine Unterdrückung der Biofilmbildung wird, mit großer Ähnlichkeit zu dem bereits erwähnten medizinischen Ansatz des Quorum quenching, durch die Inhibierung von Zell-Zell Kommunikation oder der initialen Adhäsion konkurrierender Organismen erreicht (Dong *et al.*, 2007; Augustine *et al.*, 2010).

Innerhalb eines Biofilms finden sich, mit Zunahme über die Zeit, viele inaktive und tote Zellen (Peck *et al.*, 2018). Einer der Gründe dafür ist die unzureichende Versorgung tieferer Biofilmschichten durch den Substratverbrauch außenliegender Zellen. Außer durch die bereits erwähnten Kanalstrukturen (Wilking *et al.*, 2013) kann dies auch durch ein oszillierendes Wachstum des Biofilms umgangen werden (Liu *et al.*, 2015). Letztgenanntes Verhalten stellt ein gutes Beispiel kooperativer Interaktion oder Abhängigkeit räumlich getrennter Zellen zum

Wohl der Allgemeinheit dar. Liu und Kollegen konnte zeigen, dass durch das periodische Stoppen des Wachstums peripherer Biofilmzellen die vollständige Substratlimitierung innenliegender Zellen verhindert wird. Dies ergibt sich z.B. durch die Abhängigkeit peripherer Zellen von der Ammoniumproduktion im Biofilminneren. Hierdurch wird eine Limitierung metabolisch aktiver Organismen im Inneren des Biofilms überwunden. Berücksichtigt man zusätzlich den verbesserten Schutz innenliegender Zellen vor externem Stress, weißt ein oszillierend wachsender Biofilm durch das Vorkommen einer erhöhten Zahl aktiver Zellen auch eine höhere Stabilität des gesamten Systems auf (Liu *et al.*, 2015).

### **1.2.2 Ausbildung von Gradienten und Subpopulationen**

Innerhalb der Matrix findet sich eine besondere Charakteristik von Biofilmen - die Formierung von Konzentrationsgradienten metabolisch-relevanter Substrate und Produkte (Zhang *et al.*, 1995; Stewart and Franklin, 2008). Diese resultieren aus einem dynamischen Zusammenspiel zwischen Produktion, Konsum und Diffusion der jeweiligen Substrate oder Stoffwechselprodukte (s. auch Abb. 2).

Sauerstoff stellt ein gut untersuchtes Beispiel eines solchen Gradienten dar (de Beer *et al.*, 1994; Rani *et al.*, 2007). Abhängig der physiologischen Leistung des Biofilms und der Verfügbarkeit oxidierbarer Substrate kann es zu einer sehr unterschiedlichen Ausbildung von Sauerstoffgradienten kommen. Im Falle der Sauerstoffzehrung durch stoffwechselaktive Organismen folgt daraus eine Reduktion der Konzentration zum Inneren der Aggregate. Dokumentierte Dimensionen solcher Gradienten reichen von zweistellig mikroskalierten bis mehreren 100 µm großen Bereichen (Stewart and Franklin, 2008). Innerhalb des Biofilms kommt es in vielen Fällen zu einer umfassenden Zehrung des Sauerstoffs, so dass tiefere Biofilmschichten oft als vollständig anoxische Habitate dargestellt werden (Ziegler *et al.*, 2013).

Analog zu Sauerstoff liegt auch jedes andere Substrat, welches innerhalb des Biofilms konsumiert wird, ausgehend der Quelle und in Abhängigkeit der Schichttiefe in abnehmenden Konzentrationen vor (Stewart and Franklin, 2008)(s. auch Abb. 2 A(1)). Dieser Trend ist ebenso im Rahmen des Abbaus toxischer Produkte und antimikrobieller Substanzen zu beobachten (Olsen, 2015). Unterschiede ergeben sich für Konzentrationen metabolischer Endprodukte und Intermediate des Stoffwechsels. Gradienten der End- und Abfallprodukte (z.B. im Rahmen der Methanogenese produziertes Methan (Damgaard *et al.*, 2001)) entwickeln sich entgegengesetzt der Substratkonzentration, mit der höchsten Konzentration in den innersten Schichten des

Biofilms (s. auch Abb. 2 A(3)). Intermediate des Stoffwechsels (z.B. Nitrit im Rahmen der Nitrifikation (de Beer *et al.*, 1997)) weisen in mittleren Schichten die höchste Konzentration auf, da sie z.B. im Falle eines externen Substrats zuerst produziert und dann in tieferen Schichten wieder konsumiert werden (s. auch Abb. 2 A(2)). Weitere Gradienten umfassen pH-Konzentrationen, Signalmoleküle und produzierte antagonistische Wirkstoffe (Ramsing *et al.*, 1993; Flemming *et al.*, 2016; Schlafer *et al.*, 2018), welche aufgrund der räumlichen Verteilung unterschiedlicher Spezies innerhalb eines Biofilms auch von definierten Clustern innerhalb einer Population ausgehen können (Nadell *et al.*, 2016).

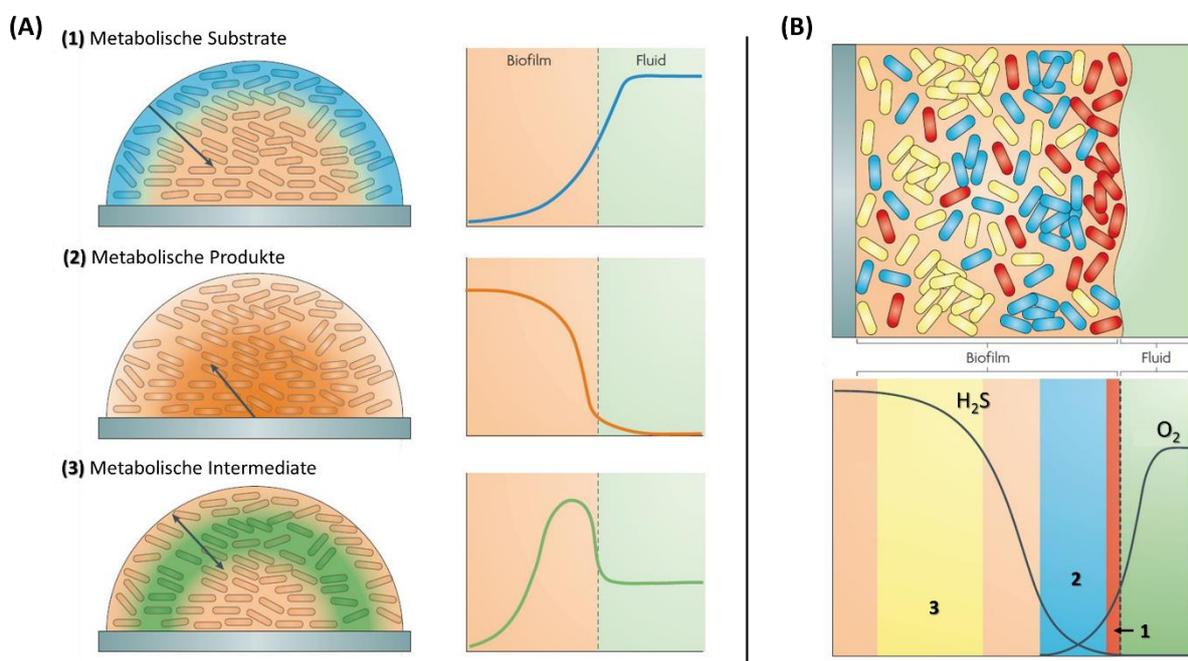


Abb. 2: Schematische Darstellung (A) chemischer und (B) physiologischer Heterogenität in Biofilmen. (A) Gezeigt werden mögliche Ausbildungen und Ausrichtungen unterschiedlicher chemischer Gradienten innerhalb eines Biofilms. (A1) Konsumierte Substrate nehmen ausgehend von ihrer Quelle in ihrer Konzentration ab, während (A2) metabolische Endprodukte eine höhere Konzentration in tieferen Schichten des Biofilms aufweisen. (A3) Intermediate, welche innerhalb des Biofilms produziert und konsumiert werden, können lokale Maxima aufweisen. (B) Zeigt die räumliche Verteilung dreier Gruppen von Mikroorganismen als Konsequenz unterschiedlicher chemischer Mikronischen, in diesem Beispiel bedingt durch gegensätzlich verlaufende Gradienten von Sauerstoff und Schwefelwasserstoff. Unterschiedliche physiologische Zonen innerhalb des Biofilms: 1 = Bereich aerober heterotropher Mikroorganismen (rote Stäbchen); 2 = Bereich Sulfat-oxidierender Mikroorganismen (blaue Stäbchen); 3 = Bereich anaerober Sulfatatmung durch Sulfat-reduzierende Organismen (gelbe Stäbchen). Abbildung modifiziert nach Stewart and Franklin (2008).

Das Zusammenspiel all dieser Gradienten führt zur Ausbildung unterschiedlicher Nischen innerhalb des Biofilms und einer damit einhergehenden physiologischen Heterogenität des Konsortiums. Die räumliche Verteilung unterschiedlicher Spezies erfolgt allerdings nicht nur anhand unterschiedlicher chemischer Heterogenität. Auch Mechanismen stochastischer Genexpression (Chai *et al.*, 2008) und das Aufkommen genetischer Stammvariationen durch Mutationsereignisse im Verlauf der Biofilmbildung spielen eine Rolle (Kirisits *et al.*, 2005). Die Kombination spontaner genetischer Variation und natürlicher Selektion führt zur Etablierung neuauftretender Heterogenität in Biofilmen (Stewart and Franklin, 2008). Auch die Ausbildung persistenter Zellen stellt ein Beispiel spontaner phänotypischer Variation innerhalb eines Biofilms dar (Balaban *et al.*, 2004).

### 1.2.3 Abhängigkeiten in Co-Kultur

Im Rahmen der Evolution von Biofilmgemeinschaften kann es zu einem Verlust bestimmter Fähigkeiten einzelner Spezies kommen (Morris, 2015). Kann die verlorene Funktion durch andere Organismen des Konsortiums kompensiert werden, kommt es dadurch zu einer Zunahme der individuellen Fitness der neuen Spezies. Dies ergibt sich vor allem durch den Entfall der Produktion kostspieliger Gemeinschaftsgüter, wie extrazellulärer Enzyme. Betrifft der Verlust eine essentielle Funktion wird die kompensierende Spezies zum Helferorganismus der neuen Stammvariante. Die Theorie hinter dieser „reduktiven Evolution“ wird als *Black Queen* Hypothese bezeichnet (Morris *et al.*, 2012). Sie ermöglicht ein Verständnis zur Bildung von Auxotrophien, der Entstehung von Schlüsselorganismen und der Stabilität koexistierender, mikrobieller Gemeinschaften (Mas *et al.*, 2016). Als Beispiel einer solch entstandenen Interaktion dient das Cyanobakterium *Prochlorococcus*, welches trotz seiner Funktion als Primär- und Sauerstoffproduzent in Abhängigkeit zu anderen Organismen durch die Reduktion des Sauerstoffstresses durch Wasserstoffperoxid steht (Morris *et al.*, 2011).

Aufbauend zur *Black Queen* Hypothese ergibt sich die Strategie zur Anreicherung bisher unkultivierbarer Mikroorganismen durch Co-Kultivierung (Stewart, 2012). Als unkultivierbar werden jene Organismen bezeichnet, welche bisher unter Verwendung herkömmlicher Labortechniken nicht in Reinkultur gebracht werden können. Unkultivierbarkeit ist dabei weniger eine Eigenschaft der Bakterien oder Archaea als vielmehr das fehlende Verständnis über essentielle Wachstumsbedingungen dieser Mikroorganismen. Die Motivation zur Erforschung und Kultivierung bisher nicht kultivierbarer Organismen liegt in deren dominanten Anteil an der Gesamtheit mikrobiellen Lebens (Yarza *et al.*, 2014). Bedenkt man, dass bereits

50% aller Medikamente mikrobiellen Ursprungs sind erschließt sich allein für die pharmazeutische Industrie ein enormes Potential in der Erweiterung des Spektrums kultivierbarer Bakterien und Archaea (Demain and Sanchez, 2009).

Zugrundeliegende Mechanismen mikrobiologischer Unkultivierbarkeit betreffen zuvor aufgeführte Aspekte spezifischer Nischenbildung, bedingt durch die zelluläre Kommunikation und Ausbildung von Gradienten bis hin zur Entwicklung von Abhängigkeiten durch den Verlust essentieller Zellfunktionen im Rahmen eines synergistischen Lebensstils.

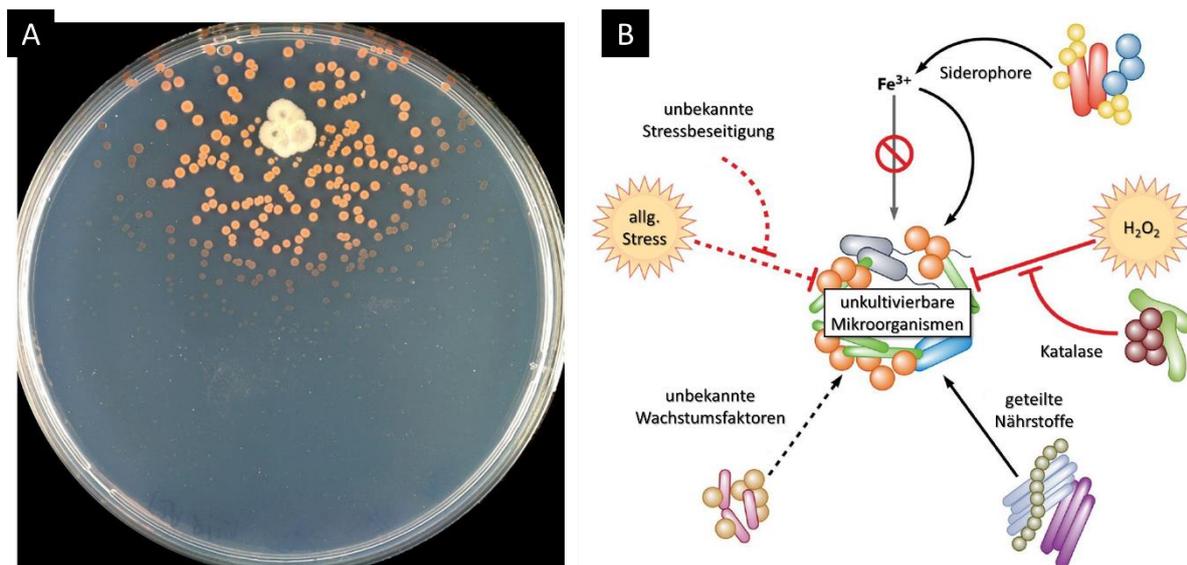


Abb. 3: Co-Kultivierung bisher unkultivierbarer Mikroorganismen. (A) Beispielhafte Co-Kultivierung eines Helfer-abhängigen und ansonsten unkultivierbaren Vertreters der Gattung *Bacillus* (kleinere orangene Kolonien). Der Stamm kann nur in relativer Nähe zum Helferstamm aus dem gleichen Ursprungshabitat (*Bacillus megaterium*, große weiße Kolonien) wachsen. (B) Zeigt eine schematische Darstellung des Einflusses von Helferorganismen auf bisher unkultivierbare Mikroorganismen. Abbildung modifiziert nach Stewart (2012).

### 1.3 Biofilmkultivierungsstrategien

Biofilme sind komplexe Konsortien mit einer dreidimensionalen Architektur, ausgeprägten Interaktion innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaften und stark beeinflusst durch die Ausbildung chemischer und physiologischer Gradienten. Das Studium dieser multizellulären Lebensgemeinschaften bedingt eine sorgfältige Wahl angemessener Kultivierungsstrategien (Røder *et al.*, 2016). Es existieren verschiedene Techniken zur Kultivierung von Biofilmen, mit unterschiedlichen Vor- und Nachteilen in der Anzucht und Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften (Azeredo *et al.*, 2017).

Eine weitgenutzte Strategie ist die Verwendung von Mikrotiterplatten (O'Toole and Kolter, 1998a). Vorteile liegen in der kostengünstigen Kultivierung multipler Ansätze und der Möglichkeit unkomplizierter, spektroskopischer Analyse per Plattenlesegerät. Ein Nachteil bei der Verwendung von Mikrotiterplatten ist der Einschluss sedimentierter Zellen während der Ausbildung der Matrix. Diese werden Teil der zu analysierenden Gesamtbiofilmmasse, obwohl sie nicht zwingend an der jeweiligen Biofilmbildung beteiligt waren. Zur Umgehung des Problems wurde das sogenannte *Calgary Biofilm Device* (CBD; s. auch Abb. 4(A)) entwickelt (Ceri *et al.*, 1999). Dieses entspricht dem Deckel einer 96-Well-Mikrotiterplatte mit zusätzlichen Zapfen passenden zu den Wells der Basisplatte. Durch Nutzung der ins Medium ragenden Zapfen als eigentliche Kultivierungsfläche wird das Problem der Sedimentation umgangen. Mittels dieser Technik wurde z.B. die synergistische Beziehung unterschiedlicher Bodenisolat untersucht (Ren *et al.*, 2015). Die Verwendung von Mikrotiterplatten erschwert allerdings die Anwendung mikroskopischer Echtzeitanalysen und Bedarf oft einer relativ hohen Zellmasse. Zudem erfolgt die Kultivierung stets im Batch-Verfahren, was den Einsatz der Platten auf Kurzzeitexperimente reduziert oder einen regelmäßigen Austausch des Mediums erfordert.

Weitere Kultivierungssysteme basieren auf der Verwendung herausnehmbarer Einsätze innerhalb Medium-durchströmter Systeme, wie das *Robbins Device* (McCoy *et al.*, 1981) und der *Drip Flow Biofilm Reactor* (Goeres *et al.*, 2009; Peck *et al.*, 2018) oder rotierender Fermenter (*Rotary Biofilm Devices*) (Kornegay and Andrews, 1968; Gomes *et al.*, 2018) (s. auch Abb. 4(B) und 4(C)). Diese Systeme bieten eine gute Möglichkeit unterschiedliche Materialien auf die Ausbildung von Biofilmen, insbesondere unter dem Einfluss von Scherkräften, zu testen. Auch können unterschiedliche Materialien in einem Ansatz getestet werden, allerdings ergeben sich sonst wenige Möglichkeiten für Hochdurchsatzanalysen und auch mit diesen Techniken ist es nicht möglich anwachsende Biofilme direkt innerhalb des Kultivierungssystems zu beobachten.

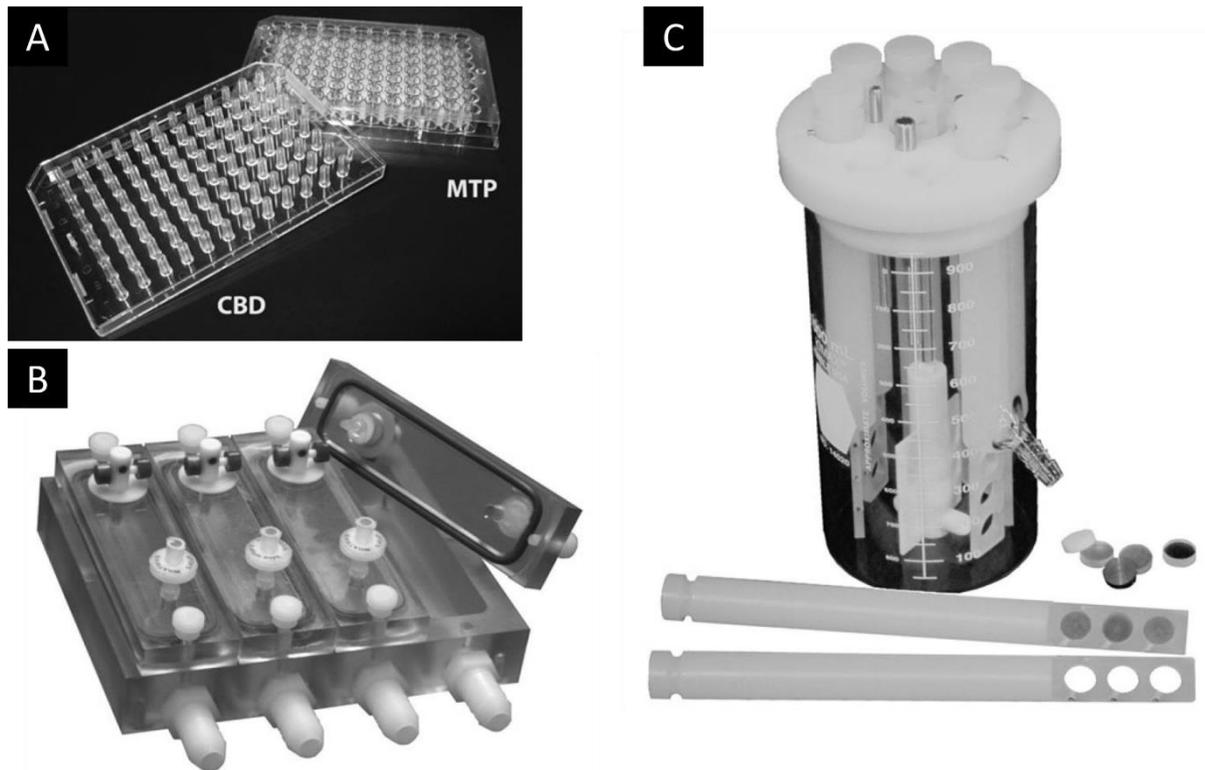


Abb. 4: Biofilmkultivierungsstrategien. Dargestellt sind (A) das *Calgary Biofilm Device* (CBD), (B) der *Drip Flow Biofilm Reactor* und (C) ein *CDC Rotary Biofilm Device* wie es vom *Center for Disease Control* (CDC) in den USA verwendet wird. (A) Das CBD entspricht dem Deckel einer Mikrotiterplatte (MTP) mit zusätzlichen in die Wells hineinragenden Zapfen. (B) Der dargestellte *Drip Flow Biofilm Reactor* besteht aus 4 Kammern welche jeweils einen Objektträger zur Biofilmanlagerung aufnehmen können. Der Reaktor wird in einem definierten Kippwinkel betrieben, wodurch das Medium passiv über den Objektträger läuft. (C) Das Rotary Biofilm Device besteht aus acht Halterungen mit Einsätzen zur Biofilmanlagerung. Die Einsätze werden zur Analyse aus dem Reaktor entnommen. Der Reaktor enthält eine magnetische Rührstange zur Durchmischung des Mediums und Generierung von Scherkräften über eine externe magnetische Rührplatte. Abbildungen entnommen aus Azeredo *et al.* (2017).

Eine besondere Form der Biofilmkultivierung liegt in der Verwendung mikroskopisch-zugänglicher Fließzellen und mikrofluidischer Systeme. Dies wird meist durch die Abdeckung einer Kanalstruktur mit einem Deckglas ermöglicht. Die Kombination aus rekombinant, fluoreszent-markierter Proteine und konfokaler Mikroskopie ermöglicht hiermit beispielsweise die Echtzeitanalyse lebender Biofilme, z.B. für *in situ* Studien variierender Genexpression (Haagensen *et al.*, 2007). Mikrofluidische Strukturen basieren ebenfalls auf dem Durchflussprinzip aber unter Verwendung kleinerer Kanaldimensionen von ca. 5 - 500  $\mu\text{m}$  (Weibel and Whitesides, 2006). Vorteile sind der Einsatz kleinerer Volumina und die Ausbildung laminarer Strömungen. Dadurch ergeben sich stabile Kultivierungsbedingungen

und die Möglichkeit Gradienten unabhängig des Strömungsverlaufs auszubilden. Zudem erlaubt die mikrofluidische Kultivierung auch eine gekoppelte Einzelzellanalyse (Wang *et al.*, 2014). Mikrofluidische Strukturen werden oft aus Glas, Kunststoff (Duro- und Thermoplaste) und Polydimethylsiloxan (PDMS) hergestellt. Besonders PDMS wird aufgrund seiner einfachen Handhabung und Biokompatibilität oft zur Fertigung mikrofluidischer Systeme eingesetzt. Das Polymer ist flexibel, gas- und lichtdurchlässig, sowie chemisch inert (McDonald and Whitesides, 2002). Limitierungen fluidischer Systeme umfassen eine oftmals komplexe Handhabung (inklusive der Notwendigkeit spezieller Laborausrüstung), die Gefahr durch Verstopfung und den Einfluss von Gasblasen, sowie den schwierigen Zugang zu Zellen innerhalb von Kultivierungskammern (Asayesh *et al.*, 2017; Azeredo *et al.*, 2017).

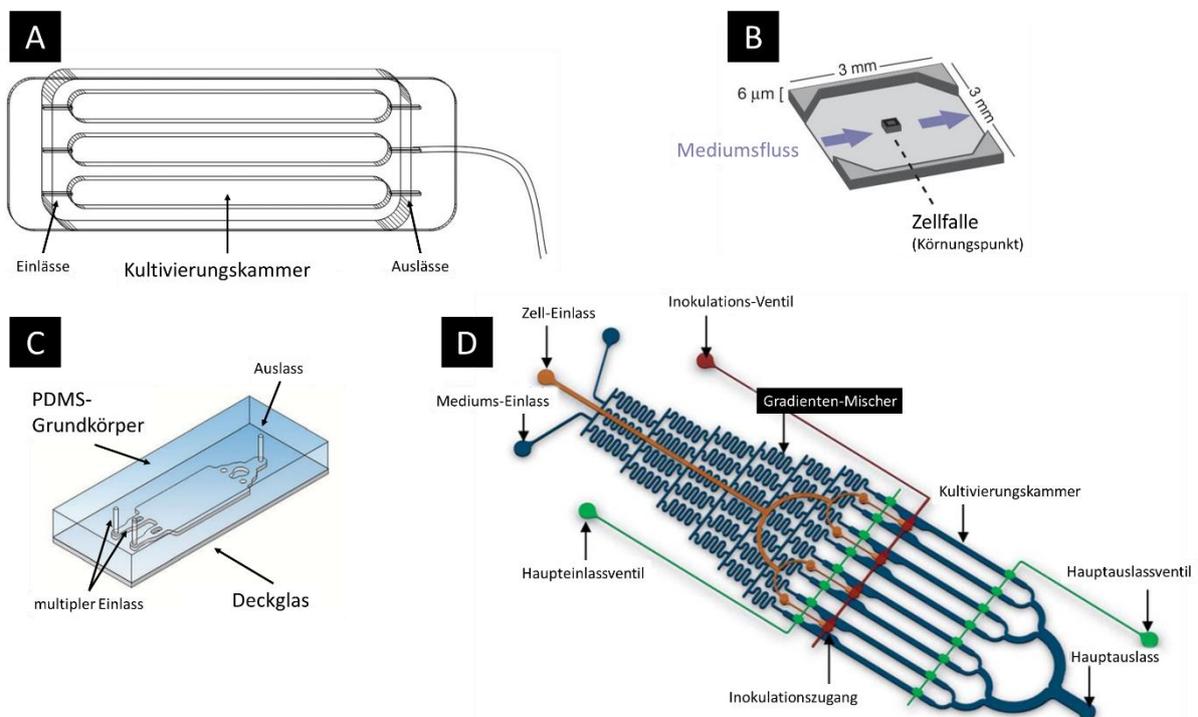


Abb. 5: Darstellung exemplarischer fluidischer/mikrofluidischer Biofilmkultivierungssysteme. (A) Schematische Zeichnung einer 3-Kanal Fließzelle. (B) Schematische Darstellung der mikrofluidischen Kammer der *Y04D microfluidic plate* (vom *EMD Milipore*). Die flache, jedoch breite Kammer bietet Platz für die Bildung von Kolonien mit Millionen von Zellen, bei gleichzeitiger Limitierung in ein zweidimensionales Wachstum und ununterbrochenem Mediumsfluss. (C) Auf PDMS und Deckglas basierte mikrofluidische Kultivierungskammer mit separaten Eingängen zur Ausbildung lateraler, chemischer Gradienten über den Verlauf des Flusses. (D) Mikrofluidisches System mit acht Kultivierungskammern, separaten Inokulationszugängen und Gradienten-Mischer für die parallele Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Konzentrationen von Signal- oder Substratmolekülen. Abbildungen entnommen und modifiziert nach Crusz *et al.* (2012), Kim *et al.* (2012), Song *et al.* (2014) und Liu *et al.* (2015).

## 1.4 Biofilme in bioelektrochemischen Systemen

In vorausgehenden Abschnitten dieser Arbeit wurde die technische Nutzung von Biofilmen bereits am Beispiel der Abwasseraufbereitung und der Produktion von Plattformchemikalien hervorgehoben. Eine weitere biotechnologische Anwendung mikrobieller Gemeinschaften liegt im Forschungsbereich bioelektrochemischer Systeme, in welchem Biofilme auf Elektroden zur Stromproduktion (Chaudhuri and Lovley, 2003; Min *et al.*, 2005), als biochemischer Sensor (Golitsch *et al.*, 2013; Rasmussen *et al.*, 2016) oder auch zur Gewinnung oxidiertes Fermentationsprodukte (Förster *et al.*, 2017) eingesetzt werden können.

Ein weitgenutztes bioelektrochemisches System stellt die mikrobielle Brennstoffzelle dar. Sie besteht in ihrem Grundaufbau aus einem anoxischen Anoden- und einem oxischen Kathodenkompartiment (Logan and Regan, 2006). Beide Kammern werden dabei über eine semipermeable Membran voneinander getrennt. Das System dient, analog dem Aufbau einer Wasserstoff-Brennstoffzelle, der räumlichen Trennung von Redoxreaktionen. Die erste Teilreaktion stellt die Oxidation des Substrates an der Anode dar. Die entstehenden Elektronen werden über einen elektrischen Widerstand an die Kathode transportiert, was den elektrisch nutzbaren Strom der Brennstoffzelle darstellt. Durch die Oxidationsreaktion kommt es im Weiteren zur Freisetzung von Protonen, welche durch die semipermeable Membran in den Kathodenraum diffundieren können. In Kombination mit der Elektronenübertragung von der Kathode findet hier dann eine Reduktion von Sauerstoff zu Wasser, als zweite Teilreaktion der getrennten Redoxreaktion, statt. Die Besonderheit mikrobieller Brennstoffzellen im Vergleich zu konventionellen Wasserstoff-Brennstoffzellen liegt in der Verwendung von Mikroorganismen zur Durchführung der Anodenreaktion (Logan, 2009). Durch die Nutzung mikrobieller Katalysatoren kann auf eine Verwendung teurer Edelmetallelektroden verzichtet werden und das mögliche Substratspektrum bioelektrischer Systeme wird durch die physiologische Vielseitigkeit der Organismen deutlich erweitert (Wei *et al.*, 2011).

Mikroorganismen welche in der Lage sind Elektronen auf Elektroden abzugeben, bezeichnet man als exoelektrogen (Logan, 2009). Der Mechanismus entspricht der nativen Übertragung von Elektronen auf extrazelluläre Elektronenakzeptoren im Zusammenhang mit anaerober Atmung. Einer der bestuntersuchteten Mechanismen stellt die Übertragung von Elektronen auf Eisen durch *Shewanella oneidensis* dar. Das gramnegative Bakterium nutzt dafür eine verlängerte Atmungskette zur Regenerierung reduzierter Reduktionsäquivalente. Im Detail erfolgt dabei ein Elektronenübertrag durch ein Setup periplasmatischer Cytochrome auf eine finale, auf der Zelloberfläche liegende Reduktase (Beblawy *et al.*, 2018).

Zur Steigerung der Effizienz bioelektrochemischer Systeme und um nativ nicht-exoelektrogene Mikroorganismen in die Lage zu versetzen mit Elektroden zu interagieren, werden zusätzliche Elektronenmediatoren verwendet (Bullen *et al.*, 2006). Zur synthetischen Verlängerung der Atmungskette werden dabei membrangängige Redox-aktive Moleküle wie Metylenblau, Resazurin, Cystein, Safranin O, AQDS (Anthrachinon-2,6-disulfonat) oder Huminsäuren eingesetzt (Sund *et al.*, 2007). Ein guter Mediator muss dabei mehrere Kriterien erfüllen. Er sollte membrangängig sowie mikrobiologisch reduzierbar sein und eine gute Kinetik an der Elektrode aufweisen (Sund *et al.*, 2007). Eine gute Abdeckung dieser Eigenschaften wurde, am Beispiel genetisch modifizierter *E. coli*-Stämme, durch den Elektronenmediator Metylenblau gezeigt (Sturm-Richter *et al.*, 2015). Metylenblau ist ein membrangängiges Phenothiazin-Derivat mit einem Redoxpotential von 0,011 V und einem Absorptionsmaximum bei 660 nm (Roller *et al.*, 1984).

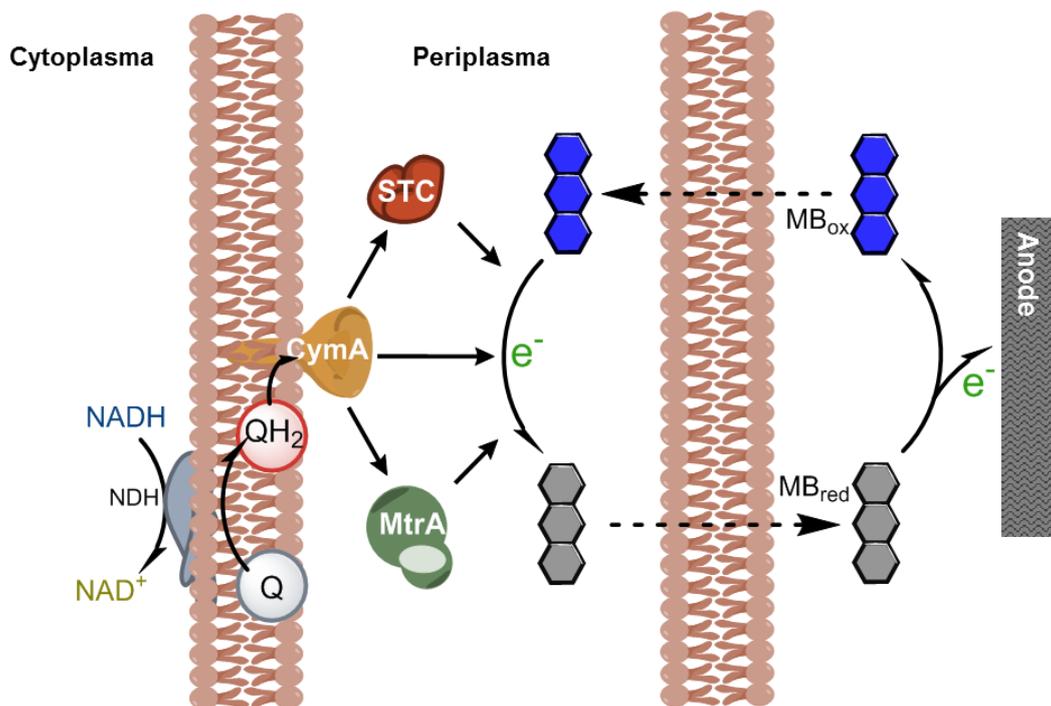


Abb. 6: Schematische Darstellung der verlängerten Atmungskette eines synthetisch exoelektrogenen *E. coli*-Stammes. Eingefügt wurden die periplasmatischen *c*-Typ Cytochrome STC, CymA und MtrA aus *Shewanella oneidensis*. Für die Interaktion mit der Elektrode als finalen Elektronenakzeptor wird weiterhin der Elektronenshuttle Metylenblau benötigt. MB<sub>ox</sub> (blau) = Metylenblau in oxidiert Form nach Elektronenabgabe an die Anode; MB<sub>red</sub> (grau) = Metylenblau in reduzierter Form nach Aufnahme von Elektronen durch die periplasmatischen Cytochrome. Abbildung modifiziert nach Förster *et al.* (2017).

Eine Limitierung in der Verwendung von Methylenblau als Elektronenmediator liegt in der antimikrobiellen Charakteristik von Phenothiazin-Farbstoffen. Dokumentiert wurden Schäden im Genom und in der Membran grampositiver und -negativer Zellen (Tuite and Kelly, 1993). Des Weiteren besitzt Methylenblau Eigenschaften eines Photosensibilisators, was sich in einer Verstärkung der antimikrobiellen Wirkung unter Einfluss von Licht ausprägt (Usacheva *et al.*, 2001).

## 1.5 Modellstämme in Co-Kultur Systemen

Biologische Forschung ist geprägt durch die Verwendung von Modellorganismen (Hunter, 2008; Ankeny and Leonelli, 2011). Für die Fragestellungen dieser Arbeit kamen die Organismen *Escherichia coli*, *Leucobacter chromiirestans*, *Micrococcus luteus* und *Pseudomonas brassicacearum* zum Einsatz.

*Escherichia coli* ist ein 1 - 3  $\mu\text{m}$  langes, motiles Stäbchen mit einem Durchmesser von 0,5  $\mu\text{m}$  sowie kommensaler Bewohner des tierischen und humanen Verdauungstraktes mit bekannten pathogenen Stammvarianten (Croxen and Finlay, 2010; Chaudhuri and Henderson, 2012). Das Bakterium ist ein weitgenutzter Modellorganismus verschiedenster Bereiche biologischer Forschung, Produktionsstamm in einer Vielzahl biotechnologisch-relevanter Prozesse und wird auch als Indikator zur Bestimmung der Wasserqualität eingesetzt (Edberg *et al.*, 2000; Chaudhuri and Henderson, 2012; Becker and Wittmann, 2015; Zhang *et al.*, 2015; McCarty and Ledesma-Amaro, 2019). Als Teil der Enterobacteriaceae weist es wie andere Mitglieder dieser Familie eine fakultativ anaerobe, nicht sporulierende Lebensweise auf, ist gramnegativ, Katalase-positiv und Oxidase-negativ. *E. coli* ist zur gemischten Säuregärung und der Atmung mit Sauerstoff, Nitrat, Fumarat und Dimethylsulfoxid (DMSO) fähig (Unden and Bongaerts, 1997). Es wächst in Temperaturbereichen von 15 - 48 °C, mit einem Optimum von 37 - 42 °C, sowie bei pH-Werten von 5,5 - 8,0 und toleriert zeitlich begrenzt Extremwerte von 2,5 bis 9,8 (Small *et al.*, 1994). Essentielle Bestandteile der EPS sind die Polysaccharide Cellulose, Kolansäure sowie Poly-*N*-Acetylglucosamin (PGA) (Mika and Hengge, 2013; Serra *et al.*, 2013).

Eine besondere in dieser Arbeit verwendete *E. coli*-Variante stellt der Stamm **JG806** dar (Förster *et al.*, 2017). Der Stamm wurde zur Verwendung in der nicht-stöchiometrischen Fermentation konzipiert. Durch die Deletion der für die Gärung benötigten Gene *frdA-D* (Fumarat-Reduktase), *adhE* (Alkoholdehydrogenase) und *ldhA* (Lactatdehydrogenase) sowie der Gene für die Acetatkinase und Phosphotransacetylase (*ack-pta*) ist dieser nicht mehr in der Lage anaerob ohne zugesetzten Elektronenakzeptor zu wachsen. Als Endprodukt fällt dabei Pyruvat an. Durch die molekularbiologische Einbringung alternativer Gärungswege und der Kombination mit einer bioelektrochemischen Regeneration von Redoxäquivalenten können so höher oxidierte Fermentationsprodukte generiert werden.

*Leucobacter chromiirestans* ist ein aerober, mesophiler, grampositiver, nicht-sporulierender und nicht-motiler Organismus aus der Familie der Microbacteriaceae und der Abteilung Actinobacteria (Sturm *et al.*, 2011). Das Bakterium wächst als Stäbchen mit 0,33 - 0,4  $\mu\text{m}$

Durchmesser und 0,74 - 1,4  $\mu\text{m}$  Länge. *L. chromiiresistens* ist in hohem Maße resistent gegenüber Chromaten und toleriert die toxische Chrom(VI)-Spezies bis zu einer Konzentration von 400 mM (Sturm *et al.*, 2018). Hexavalentes Chrom wirkt kanzerogen und mutagen, was neben der Reaktion mit DNA vor allem durch die Ausbildung reaktiver Sauerstoffspezies durch spontane, interzelluläre Reduktionen des Chroms bedingt wird (Ackerley *et al.*, 2006; Holmes *et al.*, 2008). Die Resistenzmechanismen von *L. chromiiresistens* umfassen die Ausbildung von Biofilmen, reduzierten Import, erhöhten Export und gerichtete Reduktion von Chrom, sowie eine gesteigerte Carotinoid-Produktion (Sturm *et al.*, 2018). Der entstehende Biofilm ist essentiell für das Überleben in Anwesenheit des toxischen Schwermetalls und besteht aus eDNA, Kohlenhydraten und Proteinen. Die Matrixkomponenten in Kombination mit den Carotinoiden werden als erhöhte Diffusionsbarriere für Chrom vermutet und reduzieren so den Import in die Zelle. Neben dem verringerten Import reduzieren die Carotinoide auch die toxische Wirkung von Chrom durch einen verbesserten Abbau der durch das Schwermetall entstehenden Sauerstoffradikale. Die Reduktion von Chrom(VI) zum weniger toxischen Chrom(III) (Ramírez-Díaz *et al.*, 2008) erfolgt im Cytoplasma und ist das Resultat unspezifischer Aktivität verschiedener Oxidoreduktasen. Parallel dazu geschieht der Export, neben dem spezifischen Chromat-Exporter ChrA, ebenfalls durch mehrere allgemeine Schwermetall-Transportsysteme.

*Micrococcus luteus* ist ein obligat respiratorisch lebendes Bakterium der Familie Micrococcaceae aus der Abteilung der Actinobacteria (Wieser *et al.*, 2002; Young *et al.*, 2010). Der grampositive Organismus besitzt eine charakteristische Gelbfärbung, wächst chemoorganoheterotroph mit Sauerstoff als einzig möglichem Elektronenakzeptor und bildet kokkoide Zellstrukturen mit einem Durchmesser von 0,9 - 1,8  $\mu\text{m}$  (Kocur *et al.*, 1972). Aufgrund einer unabgeschlossenen Zellteilung liegt *M. luteus* dabei meist in Form von Tetraden vor. Er ist ein häufig isolierter Organismus der menschlichen Hautflora und bekannter Luftkeim (Kloos and Musselwhite, 1975; Wieser *et al.*, 2002). Eine optimale Wachstumstemperatur von 37 °C und eines der kleinsten Genome (2,5 Mb) freilebender Actinobacteria, mit nur vier Sigma-Faktoren und vierzehn Response-Regulatoren, weisen auf eine Anpassung an eine eher enge ökologische Nische, wie der Haut von Säugetieren, hin (Young *et al.*, 2010). *M. luteus* hat nur ein geringes Set an Genen für den Transport und Metabolismus von Kohlenhydraten, findet aber, unter anderem aufgrund seiner Fähigkeit zum Abbau von Kohlenwasserstoffen, Alkenen, und Phthalaten (Eaton and Ribbons, 1982; Zhuang *et al.*, 2003), Anwendung in der Sanierung kontaminierter Standorte (Young *et al.*, 2010). Der Stamm ist nicht in der Lage Sporen auszubilden, zeigt unter Stressbedingungen aber eine hohe

Überlebensrate und bildet dormante Zellformen aus (Mukamolova *et al.*, 2002; Greenblatt *et al.*, 2004; Young *et al.*, 2010).

Der letzte in dieser Arbeit verwendete Modellstamm ist ein aus einer Denitrifikationsanlage stammendes Eigenisolat der Arbeitsgruppe Gescher. Identifiziert wurde dieser als *Pseudomonas brassicacearum*, ein gramnegatives, motiles Stäbchen mit 1,0 - 1,5 µm Länge und einem Durchmesser von 0,5 µm, welches taxonomisch der Klasse der Gammaproteobacteria zugeordnet wird (Achouak *et al.*, 2000). Das Isolat ist fakultativ anaerob und nutzt neben Sauerstoff im Rahmen der Denitrifikation auch Nitrat als alternativen Elektronenakzeptor (Grießmeier, nicht publiziert). *P. brassicacearum* wurde ursprünglich von Pflanzenwurzeln isoliert und gilt als hauptsächlicher Vertreter Wurzel-assoziiierter Bakterien bei *Arabidopsis thaliana* (Acker-Schmalwand) und *Brassica napus* (Raps) (Achouak *et al.*, 2000; Achouak *et al.*, 2004). Andere Vertreter der Gattung finden sich in einer großen Bandbreite unterschiedlicher Nischen und zeigen eine hohe funktionale Diversität auf (Scales *et al.*, 2014). Dabei kann es zur reversiblen Ausbildung unterschiedlicher Stammvarianten kommen (Achouak *et al.*, 2004). Aufgrund der guten Biofilmbildung und medizinischen Relevanz, besonders im Hinblick chronischer Infektionen und Antibiotikatoleranz, werden Organismen der Gattung *Pseudomonas* häufig als Modelle der Biofilmforschung eingesetzt (Sauer *et al.*, 2002; Burmølle *et al.*, 2010; Chiang *et al.*, 2013). In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass *P. brassicacearum* eine hohe genomische Ähnlichkeit zu *P. fluorescens* aufweist (Redondo-Nieto *et al.*, 2012), welcher bereits für unterschiedliche Fragen der Biofilmforschung eingesetzt wurde (Spiers *et al.*, 2003; Scales *et al.*, 2014).

## 1.6 Zielsetzung

Aus der (zuvor beschriebenen) Vielfaltigkeit von Biofilmen wird der enorme Anspruch an die Kultivierung und Analyse dieser mikrobiellen Gemeinschaften deutlich. Im Hinblick auf eine angestrebte Anreicherung und Analyse bisher unkultivierbarer Mikroorganismen mittels Co-Kultivierung wurde deshalb eine neue fluidische, Chip-basierte Biofilmkultivierungsplattform entwickelt (Hansen *et al.*, 2017). Hiermit soll die native dreidimensionale Ausbildung unterschiedlicher Biofilmstrukturen über den Verlauf des Kultivierungskanals separiert werden. Durch das Anbieten und die Entwicklung unterschiedlicher Gradienten soll so eine Auftrennung dieser Biofilmnischen und eine zweidimensionale Selbstassemblierung von Mikroorganismen ermöglicht werden.

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung und Optimierung des Chipsystems zur allgemeinen und gerichteten Biofilmkultivierung. Dies sollte durch die Validierung der zugrundeliegenden Idee zweidimensionaler Separierung mikrobieller Konsortien und der Anpassung neuer Analysemethoden erfolgen. Das Potential des etablierten und erweiterten Systems sollte dann erstmals auf Möglichkeiten zur direkten biotechnologischen Anwendung überprüft werden.

Durch die Entwicklung allgemeiner Protokolle zur Handhabung des Systems sollte die Reproduzierbarkeit von Biofilmkultivierungen optimiert werden. Anhand synthetisch zusammengestellter Co-Kulturmodelle sollte die Frage nach der Möglichkeit zur Ausbildung biologischer Gradienten über den Kanalverlauf beantwortet werden. Mithilfe eines *M. luteus* / *P. brassicacearum*-Konsortiums sollte die Nischenbelegung innerhalb eines physikalisch bedingten Sauerstoffgradienten gezeigt werden. Ein weiteres 2-Speziesmodell bestehend aus *E. coli* und *L. chromiirensistens* sollte ebenfalls die Ausbildung biologischer Gradienten nachweisen und zusätzlich als Validierung einer erweiterten Analysemethode unter Zuhilfenahme robotergestützter Probennahmen herangezogen werden. Hierbei sollte die Frage überprüft werden, ob es möglich ist, Proben aus dem Inneren des Chipsystems zu entnehmen und diese zu sequenzierungsbasierten Analysen zu verwenden, um so die Komposition und Auftrennung des Biofilms zu analysieren. Als erstes Experiment zur Untersuchung des biotechnologischen Potentials des Systems sollte die quantitative Analyse von Biofilmen im Anschluss einer systemintegrierten UV-Behandlung getestet werden. Dafür sollten heranwachsende *E. coli*-Biofilme unterschiedlicher Bestrahlung ausgesetzt und per Absorptionsmessung verglichen werden. Das zweite anwendungsbezogene Experiment sollte die Anwendbarkeit der Kultivierungsplattform zur Generierung neuer biotechnologisch

nutzbarer Stämme validieren. Im Speziellen sollte hierbei die Methylenblautoleranz des Gärungs-defizienten *E. coli* JG806 optimiert werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Chipsystem zur Kultivierung von Biofilmen

Diese Arbeit basiert auf der Verwendung einer neuen mikrofluidischen Plattform zur Kultivierung und Analyse von Biofilmen. Kernelement war ein neuentwickelter Silikonchip mit mäanderförmigem Kanal als zentrale Kultivierungseinheit des Systems. Ein kovalenter Verschluss des Mäanders erfolgte per Deckglas, womit die Nutzung optischer, nicht-invasiver Analysen ermöglicht wurde. Das verwendete Chipdesign wurde im Rahmen eines KIT-internen Kooperationsprojektes zwischen dem Institut für Biologische Grenzflächen 1 und dem Institut für Angewandte Biowissenschaften von Silla Hansen und Susanne Krause entwickelt (Hansen *et al.*, 2017).

#### 2.1.1 Verwendetes Chipdesign

Die Kultivierungschips hatten die Größe eines Standard Objektträgers von 76 x 26 mm (s. Abb. 7). Als Höhe ergaben sich ca. 3 mm, mit einer leichten fertigungsbedingten Ungenauigkeit (s. auch 2.1.2). Die mikrofluidische Kanengeometrie wies einen mäanderförmigen Verlauf mit 13 gleichförmigen Kurven auf. Zum besseren Verständnis erfolgte eine numerische Aufteilung des Mäanders anhand gerader Abschnitte des Kanals in 14 „Windungen“ (s. Abb. 7(C)). Diese definierten Bereiche umfassten neben dem geraden Kanalsegment auch die jeweiligen Hälften der angrenzenden Kurven. Mit einem rechtwinkligen Querschnitt von 1 mm Breite und 0,5 mm Höhe, sowie einer Verlaufsänge von 296,9 mm wies der Kanal ein Volumen von 148,45  $\mu\text{l}$  auf. Zusätzlich dazu addierten sich zwei dem Mäander vorgelegte Kammern von je 5,36  $\mu\text{l}$ , womit das Gesamtvolumen insgesamt 159,17  $\mu\text{l}$  umfasste.

Der Chip sollte nach dem Prinzip einer Fließzelle betrieben werden, womit der mikrofluidische Kanal eine Reihe von Zugangsmöglichkeiten benötigte. Als Konnektierungspunkte dienten die vorgeschalteten Kammern (s. Abb. 7(D)). Durch die variable Fertigung (s. auch 2.1.2) konnten dabei bis zu acht verschiedene Zugänge gewählt werden. Zur Verbindung des Kanals an das restliche Kultivierungssystem wurden angepasste Kanülen mit Luer-Verbinder sowie stumpfe Kapillaren mit einem Außendurchmesser von 0,8 mm verwendet.

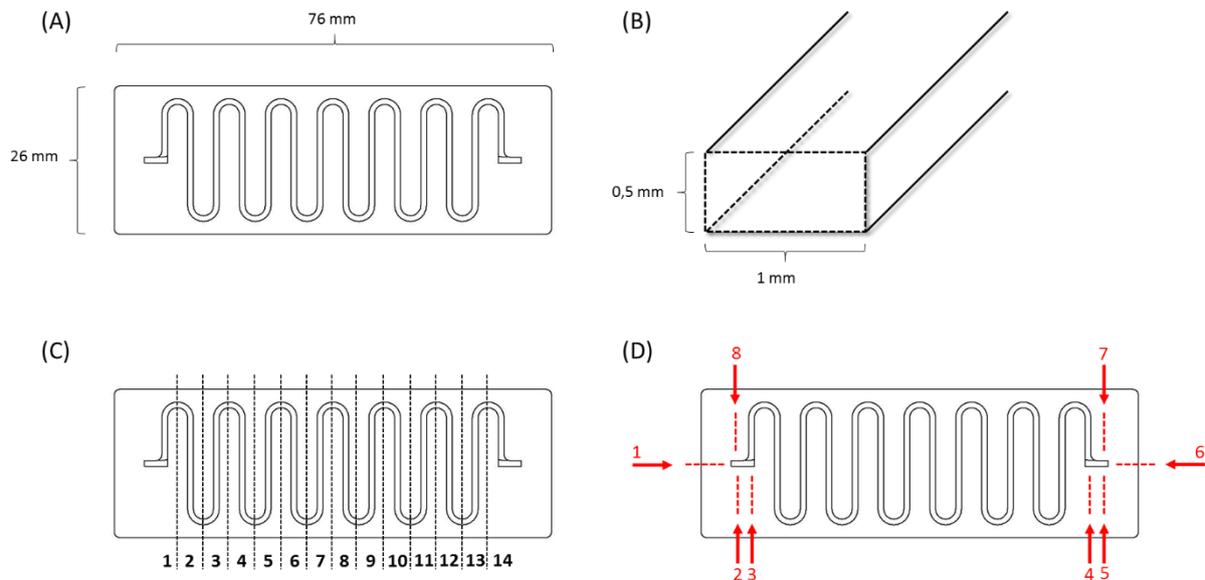


Abb. 7: Schematische Darstellungen der Chip- und Kanalgeometrie. (A) Die Chips hatten die Ausmaße eines Standard Objektträgers von 76 x 26 mm. Der dargestellte Mäander hatte eine Länge von 296,9 mm (B) und die Dimensionen des Kanalquerschnitts betragen 0,5 x 1 mm (Höhe zu Breite). (C) In dieser Arbeit erfolgte eine organisatorische Unterteilung des fluidischen Kanals in 14 Windungen. Die 1. und 14. Windung machten im Anteil der Mäanderstruktur etwa die Hälfte des Volumens anderer Bereiche aus und waren mit zusätzlichen Vorkammern verbunden. (D) Diese Vorkammern dienen als Zugangspunkte für die acht Konnektierungsmöglichkeiten (rote Pfeile) des mikrofluidischen Kanals.

### 2.1.2 Fabrikation der Chips

Die Chips bestanden aus Polydimethylsiloxan (PDMS). Als Grundmaterial wurde dabei das Sylgard® 184 Silicone Elastomer Kit der Firma *Dow Corning* (Midland (MI) - USA) verwendet. Im Kit enthaltene Silikon-Base und Härtemittel wurden nach Herstellerangaben im Massenverhältnis von 10:1 gemischt. Die Vermischung beider Komponenten brachte zusätzlich unerwünschte Gasblasen in die Silikonmasse ein, welche durch eine anschließende Entgasung mithilfe eines Exsikkators und angeschlossener Vakuumpumpe entfernt wurden. Die Fertigung von Chipsilikonrohlingen erfolgte durch die Verwendung metallener Chipmaster, welche speziell gefertigte Gussformen mit einem Negativ der gewünschten Kanalgeometrie darstellten (s. Abb. 8). Die Formen wurden von der Feinmechanischen Werkstatt der Abteilung für Physikalische Chemie Kondensierter Materie aus Messing oder Aluminium hergestellt. Zur Füllung eines Chipmasters wurden 6 g des frisch angesetzten und entgasten Silikons verwendet. Platzhalterkapillaren mit einem Durchmesser von 0,6 mm dienten als Aussparung für gewünschte Zugänge zum mikrofluidischen Kanal. Die Aushärtung der Silikonmasse erfolgte für mindestens 2 h bei 60 °C. Nach der Entformung wurden die

Chiprohlinge staubfrei in sauberen Petrischalen zwischengelagert. Der finale Fertigungsschritt bestand in der Abdeckung des Kanals mit einem Deckglas (26 x 76 mm; 170  $\mu\text{m}$  stark; Gerhard Menzel B. V. & Co. KG, Braunschweig - Deutschland). Die kovalente Bindung zwischen Silikon und Glas wurde durch die Verwendung eines Plasmaofens (Plasma Flecto 10; *Plasma Technology*, Herrenberg - Deutschland) erreicht. Im Detail erfolgte diese durch die Erzeugung eines Sauerstoffplasmas, was die Veränderung der Oberflächenchemie beider Komponenten durch die Bildung reaktiver Silanol-Gruppen auf dem Silikongrundkörper und Hydroxygruppen auf dem Deckglas ermöglichte. Kommen beide polare Gruppen miteinander in Kontakt bilden sich kovalente O-Si-O Bindungen aus. Das Programm zur Plasmagenerierung findet sich in Tabelle 1. Nach der Behandlung wurden beide Kompartimente aufeinandergepresst und für weitere 15 - 20 min bei 100 °C inkubiert. Bis zur Verwendung der fertigen Chips erfolgte eine staubfreie Lagerung bei RT.

Tab. 1: Protokoll der Sauerstoffplasmabehandlung.

Schritt	Zeit	Vorgang
1. Abpumpen	~ 120 s	Senkung des Systemdrucks auf 0,15 mbar Kontrolle der Druckstabilität, dann Zufuhr von 30 sccm
2. Stabilisierungszeit	30 s	Sauerstoff
3. Plasma	120 s	Plasmazündung mit 300 W
4. Spülen	-	
5. Belüften/Fertig	-	

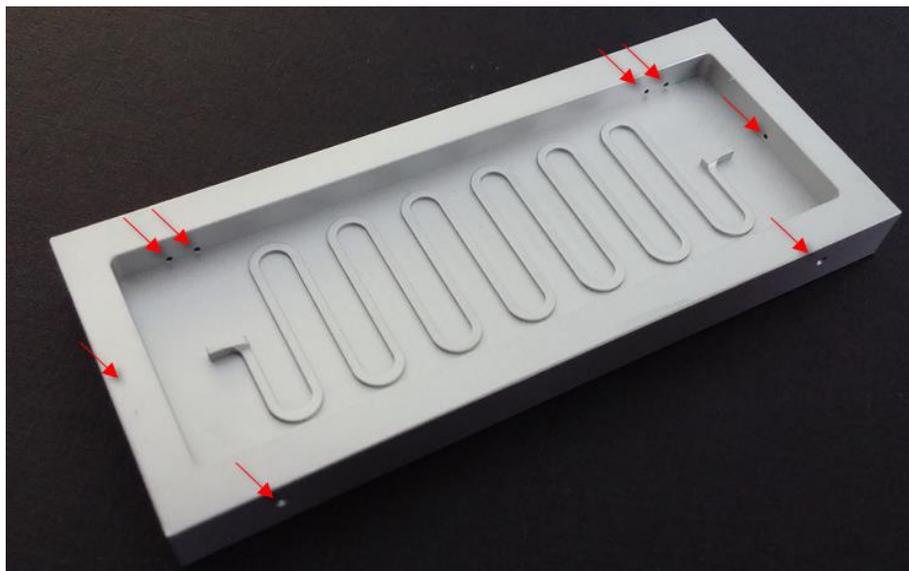


Abb. 8: Aufnahme einer Gussform mit Negativ der mikrofluidischen Kanalstruktur. Rote Pfeile markieren Bohrungen zur variablen Positionierung von Platzhalterkapillaren.

### 2.1.3 Kammer für anaerobe Kultivierungen

Zur anaeroben Biofilmkultivierung wurden speziell an die Chips angepasste, gasdichte und begasbare Kammern entwickelt, welche die Manipulation der Chip-umliegenden Atmosphäre erlaubten (s. Abb. 9). Die Kammern wurden aus Makrolon (Polycarbonat) hergestellt. Sie setzten sich aus einem Grundkörper zur Aufnahme eines Chips, einem Deckel mit Gewindebohrungen zur Verbindung eines Begasungssystems und sechs seitlichen Bauteilen zur Fixierung und Abdichtung von Kapillar-Verbindungen zusammen. Neben diesen acht Polycarbonat-Komponenten wurden zusätzliche Dichtungen aus Silikon (60° Shore-A) verwendet, um den Kontaktbereich zwischen Deckel und Grundkörper sowie seitlichen Kapillarezugängen abzudichten. Der Zusammenbau aller Teile erfolgte durch die Verschraubung mit Polycarbonat-Schrauben. Technische Zeichnungen finden sich im Anhang (s. Abschnitt 6.3).

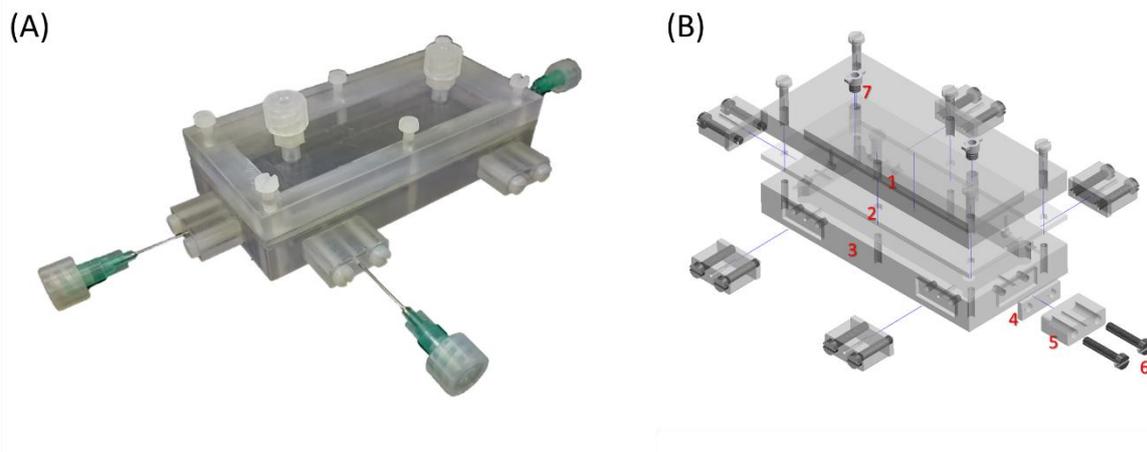


Abb. 9: Neuentwickelte Begasungskammer zur anoxischen Biofilmkultivierung. (A) Aufnahme zusammengebauter Kammer inklusive eingesetztem Chip und Verbindungskapillaren (s. auch Abb. 10). (B) Technische Zeichnung aller Einzelkomponenten. 1 = Deckelkompartiment; 2 = Dichtung; 3 = Grundkörper zur Aufnahme eines Chips; 4 = seitliche Dichtung; 5 = Fixierung seitlicher Dichtungen mit Führung für Kapillare; 6 = Polycarbonat-Schrauben (M3); 7 = Luer-Insert (Gewinde-Schlauchverbinder).

### 2.1.4 Gesamtsetup und unterstützende Infrastruktur

Der Grundkörper der neuentwickelten Kammer diente auch in Experimenten ohne Begasung als mechanische Fixierung der Chips. Fixierte Chips waren stets solchermaßen orientiert, dass das Deckglas als Bodenseite diente. Zur Vorbereitung neuer Experimente wurden unbenutzte Chips in das Kammersystem eingebaut und das Kanalsystem mittels angepasster Kapillaren (stumpf, 0,8 mm Durchmesser) verbunden (s. Abb. 10). Die seitlichen Dichtungen wurden für

die Verbindung mit der jeweiligen Kapillare durchstoßen. Zusammengebaute Chip/Kammer-Einheiten konnten so autoklaviert werden. Die Zufuhr von Medien und Zellen erfolgte durch Spritzenpumpen (Modelle: Aladdin AL4000 (*World Precision Instruments*, Sarasota - USA), 220 Legacy (*KD Scientific*, Holliston - USA) oder IVAC P1000 (*ALARIS Medical Systems*, San Diego - USA)) und einem über Luer-Verbinder vernetzten System aus Silikonschläuchen (Rotilabo-Silikonschläuche; Innendurchmesser: 1,5 mm, Außendurchmesser: 3,5 mm; *Carl Roth*, Karlsruhe - Deutschland). Mit Stopfen versiegelte Schottflaschen dienten als Sammelgefäße des Durchflusses. Zur Konnektierung wurden Kanülen mit Luer-Anschluss verwendet. Die Vernetzung und Kontrolle verschiedener Zuströme wurde durch die Verwendung von Dreiwegehähnen (Modell: BD Connecta, *Becton Dickinson*, Franklin Lakes - USA) mit Luer-Anschlüssen bewerkstelligt. Diese wurden steril erworben und konnten nicht autoklaviert werden, wodurch alle autoklavierbaren Einzelbestandteile (beinhaltete: mit Luer-Verbindern vorbereitete Schläuche sowie Sammelgefäße) separat sterilisiert wurden. Sobald alle Komponenten inklusive Chip/Kammer-Einheit steril vorlagen, wurden diese unter sterilen Bedingungen (biologische Sicherheitswerkbank, Modell: Bio II A/G; *Azbil Telstar*, Terrassa - Spanien) zusammengebaut. Jedes Sammelgefäß wurde für den nötigen Druckausgleich mit einer per Sterilfilter verschlossenen Kanüle versehen und stets als höchster Punkt des Gesamtsystems positioniert.

Als Standard für alle Experimente dieser Arbeit diente eine Chipgeometrie mit Zugängen an den Konnektierungsmöglichkeiten 1, 3 und 6 (s. Abb. 7(D) und Abb. 10). Die Anschlüsse 1 und 6 dienten der Darstellung eines Durchflusses. Mit dem Zugang an Position 3 wurde eine direkte Inokulation in den mikrofluidischen Kanal ermöglicht.

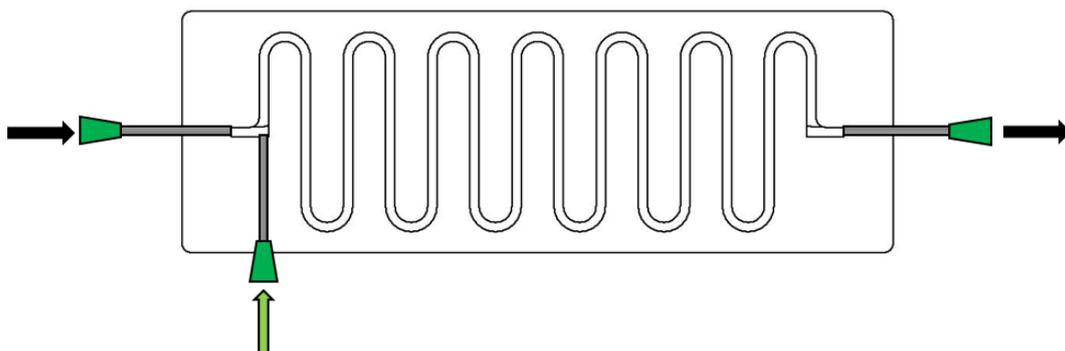


Abb. 10: Schematische Darstellung der Standardkonnektierung des mikrofluidischen Chips über angepasste Kanülen. Die Verbindungen erfolgten über die Punkte 1, 3 und 6 (s. auch Abb. 7(D)). Mit schwarzen Pfeilen wird die gewünschte Fließrichtung des Mediums dargestellt. Der grüne Pfeil zeigt die ausgewählte Zufuhr des Inokulums.

Alle Aufbauten beinhalteten die Montage von Dreiwegeadaptern an beiden zulaufenden Chipanschlüssen, wodurch eine Umleitung in separate Sammelgefäße ermöglicht wurde (s. auch Abb. 11). Dies spielte eine Rolle für den nicht invasiven Tausch von Spritzen für die Versorgung mit Nährlösung und der daraus resultierenden Entsorgung entstandener Luftblasen.

In Abhängigkeit der experimentellen Erwartungen an das System änderte sich der individuelle Aufbau des fluidischen Netzwerks. Neben variablen Verschaltungen des Schlauchsystems oder dem Einbau mehrerer Chips pro Kultivierungssetup, wurden auch Anschlüsse zur Entnahme einer Probe des Durchflusses angebracht. Für Durchflussprobenahmen wurde ein Dreiwegehahn direkt an die Endkanüle (Zugang 6, s. auch Abb. 7(D) und Abb. 11) des Chips montiert, welcher es ermöglichte zwischen dem Hauptsammelgefäß und einer gesonderten Kanüle umzuschalten. Über die zusätzliche Kanüle konnte ein mit Septum verschlossenes Gefäß angeschlossen werden, wodurch ein Auffangen des Durchflusses in räumlicher Nähe des Chipvolumens ermöglicht wurde. Nach jeder Probenahme erfolgte ein Austausch der verwendeten Kanülen.

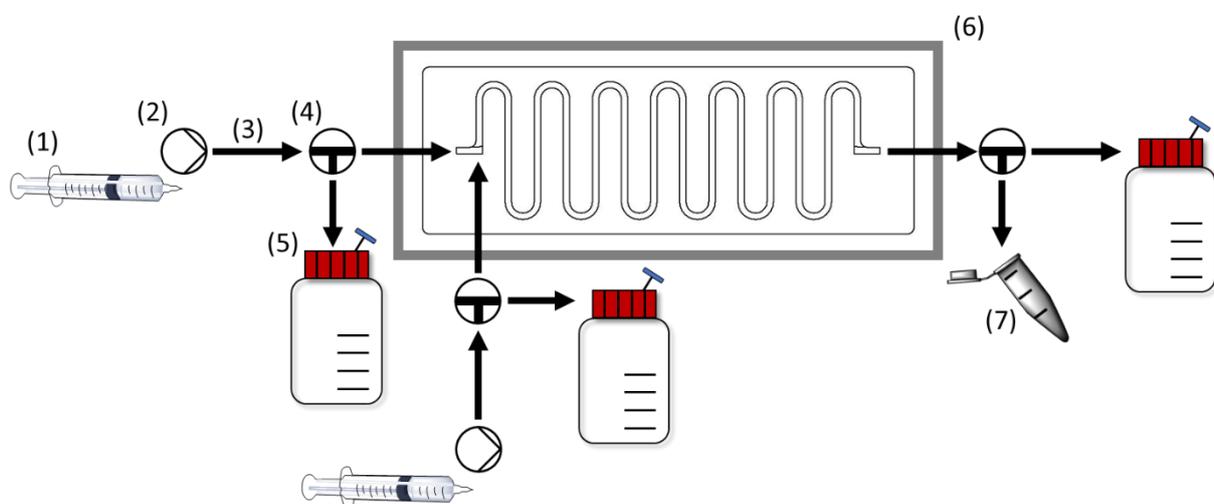


Abb. 11: Schematische Darstellung (exemplarisch) und Fließschema des Gesamtsystems. 1 = Spritzen als Vorratsgefäße für Medium oder Inokulum, 2 = Pumpe (Symbol), 3 = Fließrichtung innerhalb des Schlauchsystems, 4 = Dreiwegehahn (Symbol), 5 = Sammelgefäß für den Durchfluss inklusive Druckausgleich (mit Sterilfilter versiegelte Kanüle), 6 = Begasungskammer (schematisch; diente als Halterung in allen Experimenten) 7 = separates Sammelgefäß für Durchflussproben.

Es wurden Konstruktionen zur Positionierung der anaeroben Kammer als allgemeine Chip-Halterung konzipiert, wodurch eine optimale Platzausnutzung in Inkubatoren und die Möglichkeit strukturierterer, multiparalleler Kultivierungsaufbauten erreicht werden sollte.

Die erste Konstruktion war eine Basisplatte aus Kunststoff (360 mm x 493 mm) mit Bohrungen passend zu den Abständen der sechs Verschraubungen der Begasungskammer. Durch Verwendung längerer Schrauben bei der Konstruktion der Kammern konnten diese fest auf der Platte positioniert werden. In der Länge ergab dies elf Bohrungen mit einem Abstand von je 34 mm und zwölf in der Breite mit einem Bohrungsabstand von 43 mm.

Eine sechsstufige Halterung aus zugeschnittenen Aluprofilen und mit passenden Einsätzen aus autoklavierbarem Polycarbonat ermöglichte die Handhabung von bis zu zwölf separat betriebenen Einzelchips oder sechs in Reihenschaltung betriebener Chips (maximal drei Chips pro Reihe). Auch hier wurden die Bohrungsabstände der anaeroben Kammer dazu genutzt die Chips auf den einzelnen Ebenen der Treppenkonstruktion zu verteilen. Durch die höhenstufte Verteilung der sechs Ebenen konnten mehrere Chips parallel und platzsparend betrieben werden (s. Abb. 12).

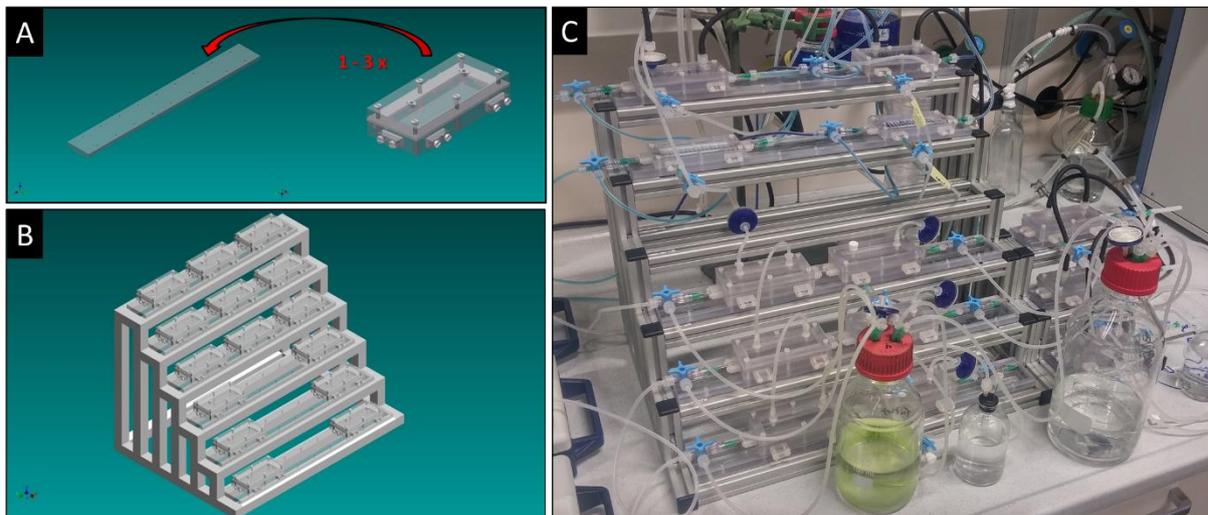


Abb. 12: Stufenkonstruktion zur Positionierung von Begasungskammern. (A, B) Schematische Darstellung möglicher Kammerpositionierungen. (A) Einzelstufe für bis zu drei Kammern. (B) Gesamtes Stufenkonstrukt mit bis zu sechs Stufen. (C) Aufnahme fertig aufgebauter Chipsets. Umfasst Kammern zur Halterung und Begasung von Chips, Silikonschlauchsysteme mit Dreiwegehahn-Schaltungen, Spritzenpumpen (linker Bildrand, nicht sichtbar) sowie Sammelgefäße inklusive Ausgleichskapillaren.

## 2.2 Analyse fluidischer Chips

Um die Biofilmkultivierungsplattform hatte sich im Rahmen des Kooperationsprojekts eine Reihe von Chip-spezifischen Analysemethoden etabliert. Diese umfassten eine Methode zur automatisierten Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung, eine direkte, robotergestützte Probenentnahme und eine angepasste Kanal-umfassende Absorptionsmessung.

### 2.2.1 Automatisierte Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) basiert auf der Verwendung von Nukleotid-Sonden zur spezifischen Markierung zellulärer RNA und DNA. Zur Identifizierung und taxonomischen Einordnung mikrobieller Spezies werden klassischerweise DNA-Sonden mit Spezifität zu ribosomaler RNA gesuchter Spezies oder höherer taxonomischer Gruppen verwendet. Nach der Hybridisierung erfolgt die Detektion mithilfe eines an der Sonde gekoppelten Fluorophors per Fluoreszenzmikroskopie. Auf Basis dieser Hybridisierungstechnik ergibt sich eine große Bandbreite optimierter und kombinierter Methoden (Amann and Fuchs, 2008; Azeredo *et al.*, 2017). Aufgrund des schnellen Abbaus ribosomaler RNA kann neben der phylogenetischen Identifikation auch bereits eine grundlegende Aussage über den physiologischen Zustand einzelner Zellen getroffen werden, da nur stoffwechselaktive Zellen Ribosomen aufweisen und entsprechend markiert werden können.

Prinzipielle Schritte für die FISH umfassen die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen, die Einbringung und Hybridisierung der Sonden, das Abwaschen nicht gebundener Sonden und als Kontrolle zur Sonden-basierten Färbung eine unspezifische Fluoreszenzfärbung aller Zellen der entsprechenden Probe oder des Biofilms.

Aufgrund des zeitintensiven Protokolls und der schwierigen manuellen Handhabung mikrofluidischer Systeme wurde im Rahmen einer Kooperationsarbeit mit dem Lehrstuhl für Molekulare Aufarbeitung von Bioprodukten (MAB) am Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik des KIT ein Protokoll zur automatisierten FISH entwickelt. Das System basierte auf einer speziell entwickelten Cartridge, welche als Halterung und Konnektierung zu einer kommerziell erhältlichen *Liquid Handling Station* (LHS) des Modells „Freedom Evo“ der Firma *Tecan* (Männedorf - Schweiz) diente (s. Abb.13). Die LHS umfasste alle nötigen Module für die Inkubation mit unterschiedlichen Temperaturen und der gekühlten Lagerung fertig prozessierter Chips. Neben der Reduzierung des Biofilmabtrages und der Erhöhung der Reproduzierbarkeit durch konstante Flussraten, stellt diese Technologie auch einen wichtigen

Schritt auf dem Weg der Optimierung und Automatisierung des Gesamtprozesses dar (Hansen *et al.*, 2017).

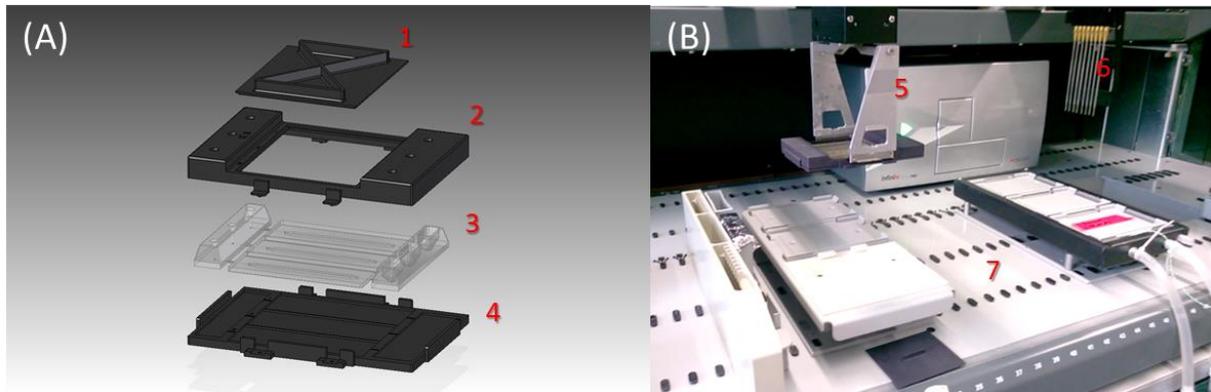


Abb. 13: Grundelemente der automatisierten FISH. (A) zeigt den Grundaufbau der Cartridge zur Verbindung mit der exemplarisch in (B) gezeigten LHS. In Rot: 1 = separater Deckel der Cartridge; 2 = Abdeckplatte mit Zugangsmöglichkeiten für die LHS; 3 = platzierte Chips und (konnektiert über 0,8 mm Kapillaren) silikongefertigte Ein- bzw. Auslassstrukturen zur Übersetzung von LHS zu Kanalstruktur; 4 = Bodenplatte der Cartridge; 5 = beweglicher Roboterarm zur Handhabung der Cartridge; 6 = bewegliches Pipetten-Modul der LHS; 7 = Grundplatte zur Positionierung benötigter Module zur Halterung, Inkubation und Lagerung der Cartridge sowie benötigter Lösungen für die FISH.

In dieser Arbeit erfolgte die Fixierung von Biofilmen vor dem Einbau in die LHS für 2 h im Durchfluss des Kultivierungssetups durch die Verwendung von 4% Formaldehyd. Die Inkubationsbedingungen waren identisch mit der vorherigen Kultivierungsgeschwindigkeit und -temperatur. Durch die Fixierung kommt es zur Kreuzvernetzung der Proteinstruktur und dem Erhalt des zum Zeitpunkt der Fixierung aktuellen Ribosomengehalts bei gleichzeitiger Abtötung der Zellen. Um osmotisch basierte Veränderungen der Zellstruktur während des Fixierungsprozesses zu reduzieren wurde Formaldehyd mit dem entsprechenden, im Experiment genutzten, Kultivierungsmedium eingesetzt. Vor dem Abbau von Chips aus dem Kultivierungssetup wurden diese für 10 min bei 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  mit PBS gewaschen. Gewaschene Chips wurden in die Cartridge eingebaut und der Rest des Protokolls per LHS durchgeführt.

Biofilmzellen wurden in allen Ansätzen durch den Einsatz von 0,1 M HCl-Lösung permeabilisiert. Die Hybridisierung erfolgte durch eine Arbeitslösung bestehend aus der gewünschten Sondenkombination und des passenden Hybridisierungspuffers. Es wurden pro 15  $\mu\text{l}$  Arbeitslösung jeweils 1  $\mu\text{l}$  jeder Sonde (Stock: 50 ng/ $\mu\text{l}$ ) eingesetzt. Für eine experimentbezogene Auflistung aller verwendeten Sondenkombinationen siehe Tabelle 2.

Tab. 2: Auflistung verwendeter Sonden für die FISH. Die Hybridisierung erfolgte bei allen Sonden mit 20% Formamid.

Name	Ziel	Sequenz und Fluorophor	Spezifität	Referenz
Ent	16S rRNA	5'- [Atto488]-CCC CCW CTT TGG TCT TGC -3'	Enterobacteriaceae	(Kempf <i>et al.</i> , 2000)
GAM42a	23S rRNA	5'- [FITC]-GCC TTC CCA CAT CGT TT -3'	Gammaproteobacteria	(Manz <i>et al.</i> , 1992)
HGC69a	23S rRNA	5'- [Atto 550]-TAT AGT TAC CAC CGC CGT -3'	Actinobacteria	(Roller <i>et al.</i> , 1994)
Competitor für GAM42a	23S rRNA	5'-GCC TTC CCA CTT CGT TT -3'	Betaproteobacteria	(Manz <i>et al.</i> , 1992)

Für die Hybridisierung der Sonden wurde ein Puffer mit 20% Formamid verwendet (s. auch Tab. 3). Nicht gebundene Oligomere wurden in einem folgenden Waschschrift unter Verwendung eines Waschpuffers (s. Tab. 4) entfernt. Die Gegenfärbung erfolgte mittels des unspezifischen DNA-Farbstoffes 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI). Als finaler Schritt erfolgte die Einbettung der Chips mit dem PBS-basierten Puffer CitiFluor AF3 (*Electron Microscopy Sciences*, Hatfield (PA) - USA).

Tab. 3: Zusammensetzung des Hybridisierungspuffers mit 20% Formamid zum Ansetzen der Arbeitslösung. *Blocking Reagent* (Roche, Basel - Schweiz) wurde in Maleinsäure-Puffer gelöst (100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5).

Substanz	Menge
5 M NaCl	3,6 ml
1 M TrisHCl (pH 8)	0,4 ml
ddH <sub>2</sub> O	10 ml
Dextran-Sulfat	2 g
20% SDS-Lösung	0,02 ml
10% <i>Blocking Reagent</i>	2 ml
Formamid (FA)	4 ml

Tab. 4: Zusammensetzung des verwendeten Waschpuffers zur Entfernung ungebundener FISH-Sonden.

Substanz	Menge
5 M NaCl	4,3 ml
1 M TrisHCl (pH 8)	2 ml
0,5 M EDTA (pH 8)	1 ml
20% SDS-Lösung	0,05 ml

*ad 100 ml ddH<sub>2</sub>O*

Das detaillierte Protokoll der automatisierten FISH mit allen verwendeten Volumina und Inkubationszeiten findet sich in Tabelle 5. Eine schematische Darstellung der Positionierung einzelner Module der automatisierten FISH-Robotik und benötigter Lösungen inklusive vorzubereitender Volumina findet sich im Anhang (s. Abschnitt 6.2).

Tab. 5: Verwendetes Protokoll automatisierter FISH. Die Durchflussrate aller Reagenzien betrug 54 µl/min.

Arbeitsschritt	Reagenz	Inkubationszeit	Temperatur
1. Permeabilisierung	360 µl 0,1 M HCl	10 min	RT
2. Waschen	360 µl ddH <sub>2</sub> O	nur Durchfluss	RT
3. Hybridisierung	370 µl Arbeitslösung (s. Text u. Tab. 3)	180 min	48 °C
4. Waschen WB	540 µl Waschpuffer (s. Tab. 4)	15 min	48 °C
5. Waschen SSC	360 µl SSC (s. Tab. 6)	15 min	RT
6. Waschen PBS	360 µl PBS (s. Tab. 7)	nur Durchfluss	RT
7. Gegenfärbung	360 µl DAPI-Lösung (1 µg/ml in ddH <sub>2</sub> O)	5 min	RT
8. Waschen	360 µl ddH <sub>2</sub> O	nur Durchfluss	RT
9. Einbettung	230 µl Einbettpuffer (s. Text)	nur Durchfluss	RT

Lagerung bei 4 °C

Tab. 6: Zusammensetzung des 20fachen SSC-Stocks.

Substanz	Menge
NaCl	175,2 g
Tri-NaCitrat-Dihydrat	88,2 g

*ad 1000 ml ddH<sub>2</sub>O*

Tab. 7: Zusammensetzung des 10fachen PBS-Stocks.

Substanz	Menge
NaCl	80 g
KCl	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14,4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,4 g

*ad 1000 ml ddH<sub>2</sub>O*

### 2.2.2 Robotergestützte Probenahme

Die automatisierte FISH ermöglichte eine sensitive und hochauflösende Auswertung kultivierter Biofilme, bedingte als Endpunktanalyse jedoch den Abbruch laufender Chipexperimente. Zur Erweiterung des Methodenspektrums wurde eine robotergestützte Probenentnahme entwickelt, welche die räumlich und zeitlich aufgelöste Analyse laufender Experimente erlaubte. Die Probenentnahme basierte auf der Injektion einer 0,4 mm starken Kanüle in den mäanderförmigen Kanal (s. Abb. 14(A)). In Kombination mit einer verbundenen Spritzenpumpe konnten so Proben kleiner Volumina (ab 1  $\mu$ l) direkt aus dem Kultivierungsbereich der Chips entnommen und in separaten Ablagen gesammelt werden. Nach der Entnahme kam es materialbedingt zur selbstständigen Versiegelung des angestochenen PDMS. Die unterstützende Robotik (s. Abb. 14(B)) ermöglichte die Positionierung der Kanüle mit einer räumlichen Auflösung von 25  $\mu$ m in X- und 10  $\mu$ m in Y- und Z-Richtung. Für eine detaillierte Beschreibung des Aufbaus und der Handhabung siehe auch Hansen *et al.* (2017).

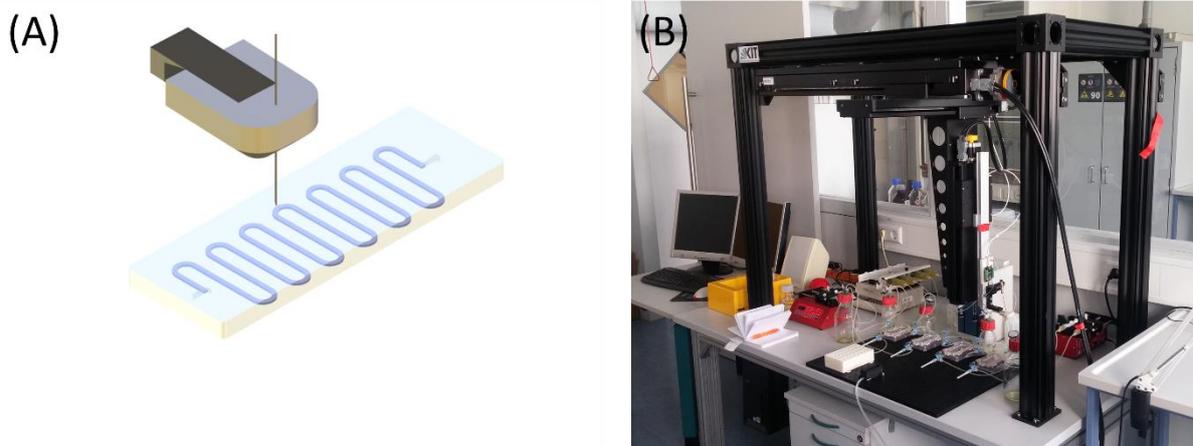


Abb. 14: Robotergestützte Probenentnahme. (A) Funktionsprinzip der Probenentnahme - geführte Injektion einer fixierten Kanüle in den mikrofluidischen Kanal. (B) Aufnahme des Roboters, inklusive Roboterarm und aufgebautem Experimentsetup.

Alle Probenahmen dieser Arbeit wurden steril durchgeführt, was eine vorherige Desinfektion verwendeter Kanülen und der zu penetrierenden Chip-Oberfläche bedingte. Die Innen- und Außenflächen verwendeter Kanülen wurden durch eine Inkubation mit 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung und anschließender Spülung mit 70% Isopropanol sterilisiert. Chipoberflächen wurden kurz vor der Injektion mit 70% Isopropanol gereinigt.

### 2.2.3 Gesamtkanal-Absorptionsmessung

Eine weitere Ergänzung des Analysepools rund um das mikrofluidische Chipsystem war die nichtinvasive Absorptionsmessung und resultierende Zellzahlbestimmung Chip-gewachsener Biofilme.

Die Messung der Absorption erfolgte mit dem Plattenlesegerät M200Pro der Firma *Tecan* und wurde durch die Verwendung einer Plattenlesegerät-kompatiblen Cartridge ermöglicht. Die speziell entwickelte Cartridge entsprach in ihrer Architektur der für die automatisierte FISH eingesetzten Halterung (s. Abb. 13(A)). Zur Ermöglichung von Durchlichtanalysen ergaben sich ergänzende Aussparungen im Bodenteil. Für die Messung wurde die Software i-Control V2.0 der Firma *Tecan* verwendet. Auf Basis eines 364-Wellplattenmusters wurde eine neue virtuelle Plattengeometrie den Dimensionen des mikrofluidischen Kanals angepasst. Die Anpassung erfolgte durch die Software Magellan V7.1 der Firma *Tecan*. Es ergab sich ein Muster aus 5 x 14 Wells, mit jeweils fünf Wells für eine der 14 Windungen der Chipgeometrie (s. auch Abb. 15). Für eine vollständige Abdeckung des möglichen Messbereichs wurde jedes Well über 36 separate Punkte (quadratische Anordnung - 6 x 6) ausgelesen.

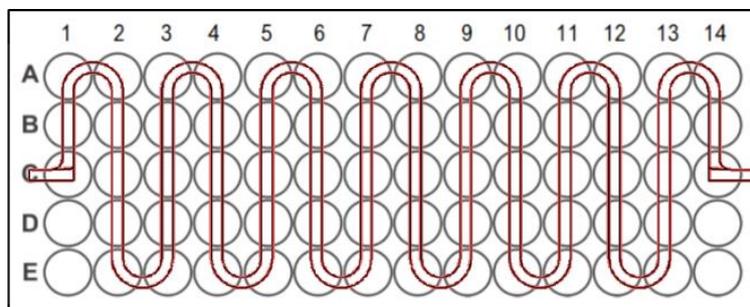


Abb. 15: Darstellung angepasster Chipgeometrie. Das verwendete Plattenraster entspricht einem Teilbereich einer 364-Wellplatte. Das Raster wurde so gelegt, dass jede Windung vollständig durch fünf Wells abgedeckt wurde. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte eine Auslesung einzelner Wells über 36 separate Messpunkte.

Zur Normalisierung fertigungsbedingter Variationen mikrofluidischer Chips wurde vor jeder Kultivierung ein individueller Leerwert bestimmt. Für die Messung des Leerwertes wurde der jeweilige Chip bereits vor der Autoklavierung und mit Medium gefüllt ausgemessen. Die Auswertung der Absorption kultivierter Biofilme erfolgte durch den Abzug des Leerwertes von der finalen Messung. Vor jeder Messung wurden die Außenflächen des Chips mit 70% Ethanol gereinigt.

Für die Kalkulation resultierender Zellzahlen innerhalb von Chipwindungen wurden die normalisierten Absorptionswerte mit einem *E. coli*-spezifischen Quotienten verrechnet. Dieser entsprach der linearen Variante der im Rahmen der Masterarbeit von Sebastian Schieß (2017) ermittelten Quotienten und bezieht sich auf die gemittelte Gesamtabsorption der drei mittleren Wells einer Windung. Die Quotienten-Bestimmung umfasste Daten aus multiplen Kultivierungen von *E. coli* DH5 $\alpha$ Z1 mit anschließenden Zellzahlanalysen per qPCR (Schieß, 2017).

$$\text{Zellzahl} = \Delta\text{Abs} \times \text{Q}^*$$

$\Delta\text{Abs} = \text{Abs}_{\text{nach der Kultivierung}} - \text{Abs}_{\text{individueller Leerwert}}$

$$\text{Q}^* (\Delta\text{Abs} > 0,08) = 7 \times 10^8$$

$$\text{Q}^* (0,08 > \Delta\text{Abs} > 0,04) = 5 \times 10^8$$

$$\text{Q}^* (\Delta\text{Abs} < 0,04) = 4 \times 10^8$$

Formel zur Bestimmung der Zellzahl kultivierter Biofilme aus normalisierten Absorptionswerten der drei mittleren Wells einer Windung (Rechenbeispiel bezogen auf Abb. 15: Für Windung 2 wird der Mittelwert der Absorptionswerte aus B2, C2 und D2 verrechnet).  $\text{Q}^*$  = Quotient zur Kalkulation der Zellzahl, variiert in Abhängigkeit des zu verrechnenden Absorptionswertes.

## 2.3 Verwendete Stämme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Stämme sind in Tabelle 8 aufgelistet. Die Stämme entstanden im Rahmen dieser Arbeit oder waren bereits Teil der Stammsammlung der AG Gescher (aufgelistete Nummerierung s. Tabelle 8).

Tab. 8: Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Stämme. „JG-Nr.“ bezieht sich auf die entsprechende Nummerierung in der Stammsammlung der Arbeitsgruppe Gescher. Chl<sup>R</sup> = Chloramphenicol-Resistenz (Arbeitskonzentration: 30 µg/ml); Kan<sup>R</sup> = Kanamycin-Resistenz (Arbeitskonzentration: 50 µg/ml).

Stamm	Bemerkungen [relevanter Genotyp]	Quelle
<i>Leucobacter chromiirestiens</i> (JG31)	Wildtyp	(Sturm <i>et al.</i> , 2011)
<i>Escherichia coli</i> K12 (JG109)	Wildtyp	(Castellani and Chalmers, 1919)
<i>Micrococcus luteus</i> (JG345)	Wildtyp	(Wieser <i>et al.</i> , 2002)
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> (JG486)	Wildtyp	(Achouak <i>et al.</i> , 2000; Ivanova <i>et al.</i> , 2009)
JG672	<i>E. coli</i> -Sicherungsstamm für pEC86; Chl <sup>R</sup> ; [DH5αZ1 + pEC86]	Laborstammsammlung AG Gescher
JG705	<i>E. coli</i> -Sicherungsstamm für pBAD-STC; Kan <sup>R</sup> ; [DH5αZ1 + pBAD-STC]	Laborstammsammlung AG Gescher
JG715	<i>E. coli</i> [DH5αZ1] - beinhaltet eine spezifische Barcode-Sequenz im Genom	Laborstammsammlung AG Gescher
JG806	<i>E. coli</i> [DH5αZ1 Δfrd ΔadhE ΔldhA Δpta-ack 4380508::( <i>P<sub>tet</sub> cymA</i> )	(Förster <i>et al.</i> , 2017)
JG1391	JG806 - Stammvariante "F2" [s. auch Tab. 34]	<i>diese Arbeit</i>
JG1392	JG806 - Stammvariante "C8" [s. auch Tab. 34]	<i>diese Arbeit</i>
JG1393	Chl <sup>R</sup> ; [JG1391 + pEC86]	<i>diese Arbeit</i>
JG1394	Chl <sup>R</sup> ; [JG1392 + pEC86]	<i>diese Arbeit</i>
JG1395	Chl <sup>R</sup> ; Kan <sup>R</sup> ; [JG1391 + pEC86 + pBAD-STC]	<i>diese Arbeit</i>
JG1396	Chl <sup>R</sup> ; Kan <sup>R</sup> ; [JG1392 + pEC86 + pBAD-STC]	<i>diese Arbeit</i>
JG1398	Chl <sup>R</sup> ; [JG806 + pEC86]	<i>diese Arbeit</i>
JG1399	Chl <sup>R</sup> ; Kan <sup>R</sup> ; [JG806 + pEC86 + pBAD-STC]	<i>diese Arbeit</i>

## 2.4 Verwendete Chemikalien und Kultivierungsmedien

Alle verwendeten Chemikalien stammten, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen *Carl Roth* (Karlsruhe - Deutschland), *Merck* (Darmstadt - Deutschland) und *Sigma-Aldrich* (Steinheim - Deutschland). Gase für die Durchführung anoxischer Kultivierungen wurden von *Air Liquide* (Ludwigshafen - Deutschland) bezogen.

Bakterien wurden der Anwendung entsprechend in verschiedenen Voll- oder Minimalmedien kultiviert. Eine Zuordnung zu Chipexperimenten findet sich in Tabelle 23 (s. Abschnitt 2.5.3). Für die Herstellung von Medien und Stammlösungen wurde ausschließlich Reinstwasser verwendet (filtriert mittels Reinstwasser-System - TKA MicroPure; *JWT*, Jena - Deutschland). Alle Medien und Lösungen wurden, falls nicht anders angegeben, per Autoklav (20 min, 121 °C) sterilisiert. Hitzeempfindliche Substanzen wurden sterilfiltriert (0,2 µm PTFE-Spritzenfilter, *Sarstedt*, Nümbrecht - Deutschland).

Verwendete **Vollmedien** basierten auf der Zusammensetzung des LB(*lysogeny broth*)-Mediums (s. Tab. 9) sowie als Substrat-reduzierte (s. Tab. 10) und mit Chromat komplementierte Varianten (s. Tab. 11).

Tab. 9: Zusammensetzung des LB(*lysogeny broth*)-Mediums.

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>	<b>Endkonzentration</b>
Trypton	10 g	10 g/l
Hefeextrakt	5 g	5 g/l
NaCl	5 g	5 g/l (85,56 mM)
(für Platten: Agar)	(20 g)	(2%)
<i>ad 1000 ml (ddH<sub>2</sub>O)</i>		

Tab. 10: Zusammensetzung von „10%igem LB“ - Substrat-reduziertes Vollmedium auf Basis des LB-Mediums.

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>	<b>Endkonzentration</b>
Trypton	1 g	1 g/l
Hefeextrakt	0,5 g	0,5 g/l
NaCl	5 g	5 g/l (85,56 mM)
<i>ad 1000 ml (ddH<sub>2</sub>O)</i>		

Tab. 11: LB-Medium mit Chromat. LB-Medium, Chromat-Stock und Wasser (\*bei Bedarf) wurden steril zusammengeführt. Der Chromat-Stock wurde sterilfiltriert. Das Endvolumen betrug stets 500 ml.

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>	<b>Endkonzentration</b>
LB-Medium (steril, s. Tab. 9)	485 ml	97%
<i>variabel:</i>		
Chromat-Stock (K <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub> in ddH <sub>2</sub> O)	5 ml *	1 mM
[100 mM]	6 ml *	1,2 mM
	7 ml *	1,4 mM
	8 ml *	1,6 mM
	9 ml *	1,8 mM
	10 ml *	2 mM
	12,5 ml *	2,5 mM
	15 ml	3 mM

\*ad 500 ml (ddH<sub>2</sub>O)

**Minimalmedien** waren, entsprechend ihrer Anwendung, als Batch beziehungsweise Chemostat-Medium konzipiert. Die Zusammensetzungen verwendeter Batch-Medien für die Generierung von Vorkulturen, der Wachstumsversuche im Erlenmeyerkolben-Maßstab sowie für den Betrieb bioelektrochemischer Systeme finden sich in den Tabellen 12 - 14.

Tab. 12: Zusammensetzung des K(Batch)-Mediums. Alle Komponenten wurden separat sterilisiert und unter sterilen Bedingungen komplementiert. SL-10 sowie Pepton- und Glucose-Lösung wurden sterilfiltriert.

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>	<b>Endkonzentration</b>
KNO <sub>3</sub> -Lösung [300 mM]	100 ml	30 mM
M9-Salze (5x) (s. Tab. 20)	200 ml	1x
CaCl <sub>2</sub> -Lösung [0,1 M]	1 ml	0,1 mM
MgSO <sub>4</sub> -Lösung [0,5 M]	2 ml	1 mM
SL-10 (1000x) (s. Tab. 19)	1 ml	1x
Pepton-Lösung [18 g/l]	10 ml	0,18 g/l
Glucose-Lösung [1 M]	10 ml	10 mM

ad 1000 ml (ddH<sub>2</sub>O)

Tab. 13: Methyleneblau-Medium für Wachstumsversuche. Alle Komponenten wurden separat sterilisiert und unter sterilen Bedingungen komplementiert. SL-10, Methyleneblau-Stock sowie Pepton- und Glucose-Lösung wurden sterilfiltriert.

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>	<b>Endkonzentration</b>
KNO <sub>3</sub> -Lösung [300 mM]	100 ml	30 mM
M9-Salze (5x) (s. Tab. 20)	200 ml	<i>Ix</i>
CaCl <sub>2</sub> -Lösung [0,1 M]	1 ml	0,1 mM
MgSO <sub>4</sub> -Lösung [0,5 M]	2 ml	1 mM
SL-10 (1000x) (s. Tab. 19)	1 ml	<i>Ix</i>
Casaminosäuren-Lösung [10 g/l]	5 ml	0,05 g/l
Glucose-Lösung [1 M]	10 ml	10 mM
<i>variabel:</i>		
Methyleneblau-Stock [50 mM]	<i>8 ml</i>	<b>400 µM</b>
	<i>24 ml</i>	<b>1200 µM</b>

*ad 1000 ml (ddH<sub>2</sub>O)*

Tab. 14: Zusammensetzung des MFC-Mediums.

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>	<b>Endkonzentration</b>
Salz-Lösung (10x) (s. Tab. 21)	100 ml	<i>Ix</i>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,18 g	9 mM
CaCl <sub>2</sub> -Lösung [0,1 M]	1 ml	0,1 mM
MgSO <sub>4</sub> -Lösung [0,5 M]	2 ml	1 mM
Spurenelementlösung MFC (s. Tab. 18)	10 ml	<i>Ix</i>
Hefeextrakt	1 g	1 g/l
<i>ad pH 7,2</i>		
<i>ad 967 ml (ddH<sub>2</sub>O)</i>		
<b>autoklavieren</b>		
<b>steril komplementieren mit:</b>		
MOPS-Lösung [1,5 M]	10 ml	15 mM
Glucose-Lösung [2 M]	10 ml	20 mM
Methyleneblau-Stock [50 mM]	11 ml	0,55 mM
Thiamin-Stock [14,8 mM]	0,1 ml	1,48 µM
AHT-Stock [4,3 mM]	0,1 ml	0,43 µM
Arabinose-Stock [500 mM]	0,2 ml	0,1 mM
Kanamycin-Stock (50 mg/ml)	1 ml	50 µg/ml
Chloramphenicol-Stock (30 µg/ml)	1 ml	30 µg/ml

Die Zusammensetzungen von Chemostat-Medien für die Biofilmkultivierung mithilfe des Chipsystems finden sich in den Tabellen 15 - 17.

Tab. 15: Zusammensetzung des K(Chemostat)-Mediums (Variante 1). Alle Komponenten wurden separat sterilisiert und unter sterilen Bedingungen komplementiert. SL-10 sowie Pepton- und Glucose-Lösung wurden sterilfiltriert.

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>	<b>Endkonzentration</b>
KNO <sub>3</sub> -Lösung [300 mM]	0,72 ml	0,216 mM
M9-Salze (5x) (s. Tab. 20)	200 ml	<i>1x</i>
CaCl <sub>2</sub> -Lösung [0,1 M]	1 ml	0,1 mM
MgSO <sub>4</sub> -Lösung [0,5 M]	2 ml	1 mM
SL-10 (1000x) (s. Tab. 19)	0,1 ml	<i>0,1x</i>
Pepton-Lösung [18 g/l]	0,18 ml	3,24 mg/l
Glucose-Lösung [1 M]	0,18 ml	0,18 mM

*ad 1000 ml (ddH<sub>2</sub>O)*

Tab. 16: Zusammensetzung des K(Chemostat)-Mediums (Variante 2). Alle Komponenten wurden separat sterilisiert und unter sterilen Bedingungen komplementiert. SL-10 sowie Pepton- und Glucose-Lösung wurden sterilfiltriert.

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>	<b>Endkonzentration</b>
KNO <sub>3</sub> -Lösung [300 mM]	6,67 ml	2 mM
M9-Salze (5x) (s. Tab. 20)	200 ml	<i>1x</i>
CaCl <sub>2</sub> -Lösung [0,1 M]	1 ml	0,1 mM
MgSO <sub>4</sub> -Lösung [0,5 M]	2 ml	1 mM
SL-10 (1000x) (s. Tab. 19)	0,1 ml	<i>0,1x</i>
Pepton-Lösung [18 g/l]	0,18 ml	3,24 mg/l
Glucose-Lösung [1 M]	2 ml	2 mM

*ad 1000 ml (ddH<sub>2</sub>O)*

Tab. 17: Zusammensetzung des Methyleneblau-Minimalmediums für Chipkultivierungen. Alle Komponenten wurden separat sterilisiert und unter sterilen Bedingungen komplementiert. SL-10, Methyleneblau-Stock sowie Pepton- und Glucose-Lösung wurden sterilfiltriert.

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>	<b>Endkonzentration</b>
M9-Salze (5x) (s. Tab. 20)	200 ml	<i>1x</i>
CaCl <sub>2</sub> -Lösung [0,1 M]	1 ml	0,1 mM
MgSO <sub>4</sub> -Lösung [0,5 M]	2 ml	1 mM
SL-10 (1000x) (s. Tab. 19)	0,1 ml	<i>0,1x</i>
Pepton-Lösung [18 g/l]	0,5 ml	9 mg/l
Glucose-Lösung [1 M]	0,5 ml	0,5 mM
<i>variabel:</i>		
Methyleneblau-Stock [50 mM]	<i>1 ml</i>	<b>50 <math>\mu</math>M</b>
	<i>7 ml</i>	<b>350 <math>\mu</math>M</b>
	<i>16 ml</i>	<b>800 <math>\mu</math>M</b>
	<i>20 ml</i>	<b>1000 <math>\mu</math>M</b>
	<i>40 ml</i>	<b>2000 <math>\mu</math>M</b>

*ad 1000 ml (ddH<sub>2</sub>O)*

Für die Komplementierung von Medien mit Spurenelementen wurden zwei verschiedene Lösungen verwendet. Die jeweiligen Zusammensetzungen finden sich in den Tabellen 18 und 19.

Tab. 18: Zusammensetzung Spurenelementlösung MFC.

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>	<b>Endkonzentration</b>
CoCl <sub>2</sub>	64,9 mg	500 $\mu$ M
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	5,0 mg	20 $\mu$ M
Fe(II)Cl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	107,4 mg	540 $\mu$ M
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	350 mg	5660 $\mu$ M
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	22 mg	130 $\mu$ M
Na <sub>2</sub> EDTA	2500 mg	6720 $\mu$ M
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	94,4 mg	390 $\mu$ M
Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	39,5 mg	150 $\mu$ M
NaCl	58,4 mg	1000 $\mu$ M
NiCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	118,9 mg	500 $\mu$ M
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	28,8 mg	100 $\mu$ M

*ad 1000 ml (ddH<sub>2</sub>O)*

Tab. 19: Zusammensetzung SL10 (1000x).

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>	<b>Endkonzentration</b>
HCl (25 %, w/v)	10 ml	68,57 mM
FeCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	1500 mg	7,54 mM
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	190 mg	0,8 mM
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	100 mg	0,51 mM
ZnCl <sub>2</sub>	70 mg	0,51 mM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	36 mg	0,15 mM
NiCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	24 mg	0,1 mM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6 mg	0,1 mM
CuCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	2 mg	0,01 mM

*ad 1000 ml (ddH<sub>2</sub>O)*

Die Zusammensetzungen aller weiteren Komplementierungslösungen finden sich in den Tabellen 20 - 22.

Tab. 20: Zusammensetzung M9-Salze (5x).

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>	<b>Endkonzentration</b>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	30 g	211,33 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15 g	110,22 mM
NH <sub>4</sub> Cl	5 g	93,48 mM
NaCl	2,5 g	42,78 mM

*ad 1000 ml (ddH<sub>2</sub>O)*

Tab. 21: Zusammensetzung Salz-Lösung (10x).

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>	<b>Endkonzentration</b>
NaCl	80 g	1370 mM
KCl	2 g	27 mM

*ad 1000 ml (ddH<sub>2</sub>O)*

Tab. 22: Zusammensetzung des Methylenblau-Stocks. Methylenblau wurde für mindestens 24 h gelöst und anschließend sterilfiltriert.

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>	<b>Endkonzentration</b>
Methylenblau	1,599 g	50 mM

*ad 100 ml (ddH<sub>2</sub>O)*

## 2.5 Allgemeine Kultivierungsarbeiten und Handhabung des Chipsystems

### 2.5.1 Stammhaltung und Kryokonservierung

Im Sinne der Stammhaltung wurde zwischen kurzzeitigen Arbeitskulturen und langfristiger Stammsicherung unterschieden. Erstere dienen dem Animpfen benötigter Vorkulturen.

Arbeitskulturen wurden auf Agar-Platten bei 4 °C gesichert. Verwendet wurden LB-Platten, stammspezifisch mit oder ohne Antibiotika (s. Tab. 8). Platten wurden längstens für drei Wochen gelagert.

Langfristige Stammhaltung erfolgte durch Kryokonservierung mit 30% Glycerin bei -80 °C. Dafür wurden 700 µl einer Übernachtskultur mit 300 µl sterilem Glycerin vermischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

### 2.5.2 Vorkulturen

Vorkulturen gingen stets aus Übernachtskulturen mit LB-Medium (inklusive benötigter Antibiotika) und von Platte hervor. Im Falle einer Weiterkultivierung in Minimalmedium wurden Übernachtskulturen in dem entsprechenden Medium gewaschen oder für eine zweite Übernachtskultur in das finale Minimalmedium überführt. Die Kultivierungstemperatur für alle *E. coli*-Varianten sowie für *P. brassicacearum* lag bei 37 °C. *M. luteus* und *L. chromiirensistens* wurden bei 30 °C kultiviert. Alle planktonischen Kultivierungen erfolgten unter oxidischen Bedingungen und im Schüttelinkubator (New Brunswick Innova 44, Eppendorf, Hamburg - Deutschland) bei 130 rpm.

### 2.5.3 Inokulation und Kultivierung mikrofluidischer Chips

Als Inokulum für Chipexperimente wurde, falls nicht anders angegeben, stets eine Übernachtskultur auf  $OD_{600} = 0,15$  eingestellt. Im Falle von 2-Spezies-Co-Kultivierungen wurden zwei separate Monospezies-Vorkulturen auf eine Gesamt- $OD_{600} = 0,15$  mit gleichem Anteil beider Mikroorganismen eingestellt. Die Organismen wurden dabei stets in entsprechendem Kultivierungsmedium aufgenommen beziehungsweise verdünnt. Für Replikate erfolgte die Chipinokulation über unterschiedliche Spritzen gefüllt mit identischem Vorkultur-Batch.

Vor der Inokulation wurden der mikrofluidische Kanal und alle Zugänge (Medium- und Inokulationskapillare) vollständig mit Medium geflutet. Eventuelle Gaseinschlüsse innerhalb des Schlauchsystems wurden über vorgeschaltete Sammelgefäße entsorgt. Das Protokoll zur Inokulation gliederte sich in mehrere Phasen. In der ersten Phase erfolgte eine schnelle Flutung des Schlauchvolumens des Inokulationszugangs (Pumpgeschwindigkeit > 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ ). Um das vorgeflutete Kanalsystem nicht zu belasten und parallel zu beimpfende Versuche gleichzuschalten, erfolgte der Durchfluss in dieser Phase ausschließlich in vorgeschaltete Sammelgefäße. Zur Überbrückung des Totvolumens der Zugangskapillare (kalkuliertes Volumen: 150  $\mu\text{l}$ ), wurde für 15 min mit einer Flußrate von 10  $\mu\text{l}/\text{min}$  gepumpt. Um eine Kontamination des Mediumszugangs zu reduzieren, wurde während der Inokulation zeitgleich Medium in fünffacher Rate der Pumpgeschwindigkeit des Inokulums zugeführt. Im letzten Schritt erfolgte, falls nicht anders angegeben, eine einstündige Inokulationsphase mit reduzierter Geschwindigkeit. Die kombinierte Flußrate (Medium und Inokulum) der finalen Phase entsprach stets der späteren Kultivierungsgeschwindigkeit.

Chipkultivierungen wurden mit Flußraten zwischen 2,5 und 10  $\mu\text{l}/\text{min}$  durchgeführt. Falls nicht anders vermerkt wurden Kultivierungen von *M. luteus* und *P. brassicacearum* immer mit 10  $\mu\text{l}/\text{min}$  durchgeführt (s. auch Tab. 23).

Tab. 23: Auflistung aller experimentspezifischen Varianten fluidischer Chipkultivierungen. Temp. = Kultivierungstemperatur;  $V_{\text{Pumpe}}$  = Kultivierungsgeschwindigkeit/Pumprate; \* = Pumprate variierte über den Verlauf des Setups; Sondenkomb. = für FISH-Endpunktanalysen verwendete Sondenkombination.

<b>(Co-)Kultur</b>	<b>Aufbau</b>	<b>Medium</b>	<b>Temp.</b>	<b><math>V_{\text{Pumpe}}</math></b>	<b>Sondenkomb.</b>
<i>M. luteus</i> (JG345)	s. Abb. 11 - unbegast	s. Tab. 15	30 °C	10 $\mu\text{l}/\text{min}$	-
<i>M. luteus</i> (JG345) / <i>P. brassicacearum</i> (JG486)	s. Abb. 11 - N <sub>2</sub> -begast / unbegast	s. Tab. 16	30 °C	10 $\mu\text{l}/\text{min}$	GAM42a (inkl. Competitor) / HGC69a
<i>L. chromiirestans</i> (JG31) / <i>E. coli</i> K12 (JG109)	s. Abb. 11 - unbegast	s. Tab. 11	RT	2,5 $\mu\text{l}/\text{min}$	Ent / HGC69a
JG806 (Stammentwicklung)	s. Abb. 16 - N <sub>2</sub> -begast	s. Tab. 10	37 °C	5 - 7 $\mu\text{l}/\text{min}$ *	-

### 2.5.4 Setup-Varianten

Der Basisaufbau aller Experimente entspricht dem in Abbildung 11 gezeigten Setup mit zwei separaten Zugängen und einem Ausgang. Für die Generierung neuer methylenblautoleranter Stammvarianten wurde auf dieser Basis eine Verschaltung dreier Chips in Reihe zusammengestellt (s. Abb. 16).

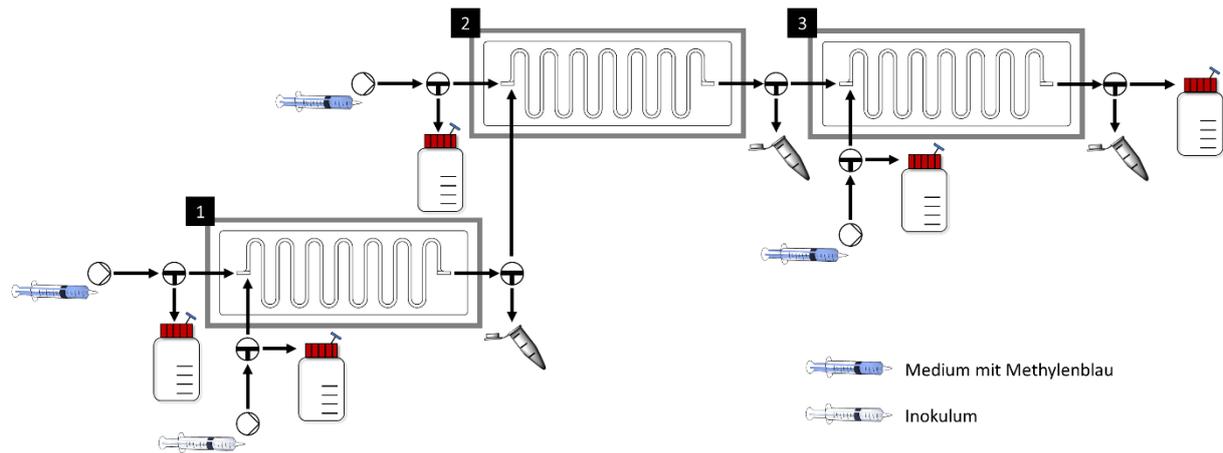


Abb. 16: Schematische Darstellung des erweiterten Aufbaus zur Generierung methylenblautoleranter Stämme. Für eine Beschreibung der Symbole siehe Abb. 11.

### 2.5.5 Chromtoleranztest (96-Well)

Zur Bestimmung der kritischen Chromkonzentration für *E. coli* wurden Kultivierungen im 96-Wellplattenmaßstab durchgeführt. Kultiviert wurde bei RT mit LB-Medium ohne sowie mit 1,0 / 1,2 / 1,4 / 1,6 / 1,8 / 2,0 und 2,5  $\mu\text{M}$  Chrom(VI). Für jede Konzentration wurden fünf Replikate angesetzt. Die Absorptionsmessung erfolgte täglich mithilfe des M200Pro und der Kontrollsoftware „i-Control V2.0“ (Tecan, Männedorf - Schweiz).

### 2.5.6 Vorscreening Methylenblauexperiment

Die Stammentwicklung neuer Methylenblau-toleranterer JG806-Varianten beinhaltete die Ausplattierung entnommener Flüssigproben auf Vollmedium-Agarplatten mit 200  $\mu\text{M}$  Methylenblau. Zur Vorauswahl der geernteten Stämme wurden neu angewachsene Biofilme (Kolonien) in einem 96-Wellplatten-Kultivierungsassay auf ihre Toleranz gegenüber Methylenblau untersucht.

Hierfür wurden zunächst die benötigte Vorkulturen ebenfalls im 96-Wellplattenmaßstab angesetzt. Dafür wurden in die zu beimpfenden Wells einer Vorkulturplatte jeweils 200  $\mu\text{l}$  LB vorgelegt. Pro zu testender Kolonie wurde jeweils ein Well der Vorkulturplatte angeimpft. Als Kontrolle wurden zusätzliche Ansätze mit dem Ausgangsstamm (JG806) vorbereitet. Die Plattendeckel wurden für alle Kultivierungen mit Parafilm verschlossen. Kultivierungen erfolgten für 24 h bei 37 °C und 130 rpm unter Zuhilfenahme des Duetz-Systems (Duetz *et al.*, 2000; *EnzyScreen*, Heemstede - Niederlande). Eine zweite Vorkulturplatte mit 180  $\mu\text{l}$  LB pro Well wurde vorbereitet und mit 20  $\mu\text{l}$  der ersten Vorkultur beimpft. Die Kultivierung der zweiten Platte erfolgte für 12 h unter ansonsten gleichen Bedingungen. Hervorgegangene Kulturen entsprachen den im Wachstumsscreen mit Methylenblau eingesetzten Zellen.

Die Platte für die Testkultivierung wurde mit Minimalmedium (s. Tab. 13) ohne, sowie mit 200, 400, 800 und 1200  $\mu\text{M}$  Methylenblau vorbereitet (s. auch Plattenschema in Tab. 24). In jedes Well wurden 100  $\mu\text{l}$  des entsprechenden Mediums vorgelegt. Angeimpft wurde mit jeweils 10  $\mu\text{l}$  Vorkultur. Alle Stämme wurden als Duplikat für jede zu testende Methylenblaukonzentration angesetzt (s. auch Tab 24). Platten wurden bei 37 °C innerhalb des Plattenlesegeräts M200Pro kultiviert. Alle 5 min wurde für jedes Well die optische Dichte bei 850 nm gemessen. Die Gesamtkultivierungsdauer betrug 12 h.

Tab. 24: Plattenschema (96-Wellplatte) für das Vorscreening auf Methylenblautoleranz neuer Stammvarianten aus Stammentwicklungsexperimenten mit JG806. Pro Well wurden 100 µl Minimalmedium vorgelegt. Für eine Übersicht der verwendeten Methylenblaukonzentrationen siehe Farbschema der Legende. Angeimpft wurde mit jeweils 10 µl LB-Vorkultur. K = Kontrolle (Ausgangsstamm JG806); 1 - 6 = zu testende Stammvarianten; (I)/(II) = Repliknummerierung.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	K-1 (I)	-	3 (I)								
B	-	K-1 (II)	-	3 (II)								
C	-	K-2 (I)	-	4 (I)								
D	-	K-2 (II)	-	4 (II)								
E	-	1 (I)	-	5 (I)								
F	-	1 (II)	-	5 (II)								
G	-	2 (I)	-	6 (I)								
H	-	2 (II)	-	6 (II)								

	Minimalmedium (MM) ohne Methylenblau (Mb)
	MM + 200 µM Mb
	MM + 400 µM Mb
	MM + 800 µM Mb
	MM + 1200 µM Mb
	ddH <sub>2</sub> O

### 2.5.7 Wachstumsversuche (Methylenblautoleranz)

Wachstumsversuche zur Validierung der Methylenblautoleranz der Stämme JG806, JG1391 und JG 1392 erfolgten bei 37 °C und 130 rpm, sowie im Triplikat in identischen 300 ml-Erlenmeyerkolben. Es wurde in einem Volumen von 50 ml kultiviert (oxisches Minimalmedium, s. Tab. 13). Die Vorkultur wurde über Nacht in LB-Medium bei 37 °C und 130 rpm angezogen.

Die Entnahme von Proben erfolgte stündlich. Direkt durchgeführte Dichtebestimmungen erfolgten bei 850 nm. Proben ab einer Dichte von OD<sub>850</sub> > 0,3 wurden vor der Messung verdünnt.

## 2.6 Molekularbiologische Methoden

### 2.6.1 DNA-Extraktion genomischer DNA

Genomische DNA von Flüssigkulturen wurde mithilfe des *Wizard Genomic DNA Purification-Kits* der Firma *Promega Corporation* (Madison - USA) isoliert. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Elution gereinigter DNA erfolgte in 50 µl ddH<sub>2</sub>O.

Die Lagerung isolierter genomischer DNA erfolgte bei 4 °C.

### 2.6.2 Isolation von Plasmiden

Plasmidisolationen erfolgten mittels des *Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification Systems* der Firma *Promega Corporation* (Madison - USA) und nach Herstellerangaben.

Tab. 25: Auflistung in dieser Arbeit verwendeter Plasmide. Chl<sup>R</sup> = Chloramphenicol-Resistenz; Kan<sup>R</sup> = Kanamycin-Resistenz; P<sub>tet</sub> = Tetracyclin induzierter Promotor; P<sub>ara</sub> = Arabinose induzierter Promotor.

Plasmid	relevanter Genotyp	Referenz
pEC86	Chl <sup>R</sup> , <i>ccmABCDEFGH</i> , P <sub>tet</sub>	(Arslan <i>et al.</i> , 1998)
pBAD-STC	Kan <sup>R</sup> , <i>stc</i> , P <sub>ara</sub>	(Sturm <i>et al.</i> , 2015)

Die Lagerung isolierter Plasmide erfolgte bei -20 °C.

### 2.6.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die gezielte Amplifizierung von DNA wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. In dieser Arbeit erfolgte dies im Rahmen der Transformationskontrolle und als Vorbereitung für 16S-rDNA Amplicon Sequenzierungen.

Für ersteres wurde ein fertiger Mix auf Basis einer Taq-DNA-Polymerase (MangoMix; *Bioline*, Luckenwald - Deutschland), verwendet. Als Template wurden Kolonien von Selektionsplatten in die Reaktion eingesetzt. Kontrollansätze erfolgten mit jeweils 1 µl aufgereinigtem Plasmid.

Die Ziel-DNA aus Proben für 16S-rDNA Amplicon Sequenzierungen musste vorab mit Adaptoren versehen werden. Dies erfolgte durch eine Amplifizierung mittels PCR BIO HiFi-Polymerase (PCR Biosystems, London - England). Eingesetzt wurden jeweils 1 µl Probe.

Alle Reaktionen wurden mit Thermocycler der Firma *Bio-Rad* (München - Deutschland) durchgeführt (verwendete Modelle: C1000, C1000 Touch und S1000). Die Zusammensetzungen der Reaktionsansätze sind, abhängig der verwendeten Polymerase, in Tabelle 26 beziehungsweise Tabelle 27 aufgeführt.

Tab. 26: Einfacher Reaktionsansatz MangoMix.

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>	<b>Endkonzentration</b>
MangoMix (2x Mastermix)	15 µl	1x
Primer (vorwärts) [2 µM]	7,5 µl	500 nM
Primer (rückwärts) [2 µM]	7,5 µl	500 nM
DMSO	1 µl	

Tab. 27: Einfacher Reaktionsansatz HiFi-Polymerase.

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>	<b>Endkonzentration</b>
PCRBIO Reaktionspuffer [5x]	10 µl	1x
Primer (vorwärts) [10 µM]	2 µl	400 nM
Primer (rückwärts) [10 µM]	2 µl	400 nM
PCRBIO HiFi Polymerase [2 u/µl]	0,5 µl	

*ad 50 µl (ddH<sub>2</sub>O)*

Eine für diese Arbeit relevante Auflistung verwendeter Primer und Programme zur Durchführung der PCR-Reaktionen findet sich in den Tabellen 28 und 29.

Tab. 28: Liste verwendeter Primer. # = Arbeitsgruppen-interne Nummerierung, F = vorwärts Primer, R = rückwärts Primer.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Sequenz (5' - 3')</b>
#788	Test auf pEC86; R	CGT TGA TAT ATC CCA ATG GC
#789	Test auf pEC86; F	GCG TTT AAG GGC ACC AAT AA
#1194	Test auf pBAD-STC; F	GAT TAG CGG ATC CTA CCT GAC
#1195	Test auf pBAD-STC; R	CTC TCA TCC GCC AAA ACA GC
#1610 (Bact_341F)	16S-rDNA Amplifizierung	CCT ACG GGN GGC WGC AG
#1611 (Bact_805R)	16S-rDNA Amplifizierung	GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC

Tab. 29: Programmierte Parameter relevanter PCR-Reaktionen.

<b>Schritt</b>	<b>Parameter relevanter Primerkombinationen</b>		
	#788/789	#1194/1195	#1610/1611
Pre-Denaturierung (95 °C)	5 min		3 min
Denaturierung (95 °C)	30 s		15 s
Anlagerung	30 s / 50 °C		15 s / 56 °C
Elongation (72 °C)	30 s		20 s
Zyklen	30x		30x
finale Elongation (72 °C)	5 min		5 min
<b>Ansatz</b>	MangoMix (30 µl)		HiFi (50 µl)
<b>Template</b>	Kolonie		Flüssigprobe

#### 2.6.4 Agarose Gelelektrophorese

Zur Auftrennung amplifizierter DNA wurden 1%ige (w/v) Agarose-Gele in TAE-Puffer (1x, s. auch Tab. 30) und ein elektrisches Feld von 120 V verwendet (*Bio-Rad*, München - Deutschland). Für die Herstellung eines einzelnen Gels wurden 60 ml TAE-Puffer (1x) und 0,6 g Agarose bis zum vollständigen Lösen der Agarose aufgeköcht, mit 6 µl einer 10%igen Midori Green Lösung (*Nippon Genetics*, Dueren - Deutschland) versetzt und in Gelkammern mit vorbereiteten Taschenformern gegossen. Gele härteten bei RT für mindestens 30 min aus.

PCR-Ansätze mit HiFi-Polymerase wurden mit Ladepuffer (6x, s. auch Tab. 31) versehen, für Ansätze mit MangoMix war dies nicht nötig. Als Größenmarker wurde der GeneRuler 1 kb DNA Ladder (*Thermo Scientific*, Waltham - USA) verwendet.

Die Bildgebung erfolgte durch Aufnahmen mit einem ChemiDoc XRS+ System der Firma *Bio-Rad*.

Tab. 30: Zusammensetzung des 50fachen TAE-Puffer.

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>	<b>Endkonzentration</b>
Tris	243,3 g	2 M
EDTA	14,6 g	0,05 M

*mit Eisessig auf pH 8 einstellen  
ad 1000 ml (ddH<sub>2</sub>O)*

Tab. 31: Zusammensetzung des 6fachen Ladepuffers.

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
Glycerin	24 ml (30,24 g)
50x TAE-Puffer (s. Tab. 30)	4,7 ml
4 ml Bromphenolblau (0,25%, w/v)	4 ml
ddH <sub>2</sub> O	11,2 ml

### 2.6.5 Aufreinigung von PCR-Produkten

Per Gelelektrophorese fragmentierte Amplifikate wurden mittels *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* der Firma *Promega Corporation* (Madison - USA) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Elution gereinigter DNA erfolgte in 50 µl ddH<sub>2</sub>O.

### 2.6.6 Quantifizierung von DNA

Die Konzentration aufgereinigter DNA wurde mittels Nano Drop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham - USA) quantifiziert. Es wurde stets 1 µl Probe eingesetzt. Als Leerwert diente ddH<sub>2</sub>O. Der DNA-Gehalt einer Probe wurde anhand der Extinktion bei 260 nm bestimmt. Durch das aufgenommene Spektrum und der Bildung der Quotienten der Extinktionswerte zwischen 230 nm, 260 nm und 280 nm konnte die Reinheit der DNA überprüft werden.

### 2.6.7 Transformation

Die Einbringung von Plasmiden erfolgte durch Elektroporation. Verwendet wurden ein Elektroporator (Modell: MicroPulser) sowie Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand: 1 mm) der Firma *Bio-Rad*. Für die Transformation wurden 100 µl einer Lösung elektrisch kompetenter Zellen und 1 µl Plasmidlösung in vorgekühlten Küvetten (4 °C) vermischt. Nach Ausführung des elektrischen Pulses erfolgte eine sofortige Zugabe von 500 µl LB-Medium in die Küvette. 500 µl der frischen Transformanten/LB-Lösung wurden anschließend in 500 µl LB-Medium überführt und für 1,5 h bei 37 °C kultiviert. Eine Selektion auf positive Transformanten erfolgte durch Ausplattieren auf mit Antibiotika versehenen LB-Agarplatten und anschließender Übernachtskultivierung bei 37 °C.

**Elektrisch kompetente Zellen** wurden stets aus frischen Flüssigkulturen angesetzt. Dazu wurde eine Übernachtskultur des zu transformierenden Bakteriums in frisches LB (inklusive eventueller Antibiotika) überführt und für weitere 3 - 5 h kultiviert. 1 ml einer solchen

Bakterienkultur wurde für 5 - 10 min auf Eis inkubiert, dreimal mit 4 °C kaltem ddH<sub>2</sub>O gewaschen und final in selbigem aufgenommen. Das Waschen der Zellen erfolgte durch kurze Zentrifugation (30 s, maximale Geschwindigkeit Tischzentrifuge 5418; *Eppendorf*, Hamburg - Deutschland) mit anschließender Aufnahme pelletierter Zellen in 4 °C kaltem ddH<sub>2</sub>O. Zellen und Wasser wurden stets auf Eis gehalten.

Da nur aufgereinigte und in ddH<sub>2</sub>O gelöste Plasmide verwendet wurden (s. auch 2.6.2), konnte auf eine zusätzliche Dialyse verzichtet werden.

### **2.6.8 Sequenzierung und bioinformatische Analyse**

Alle Sequenzierungsarbeiten erfolgten extern durch *IMG M Laboratories* (Martinsried - Deutschland). Durchgeführt wurden 16S-rDNA Amplicon Sequenzierungen sowie Metagenomanalysen basierend auf der Illumina Sequenzierungstechnologie (Kozich *et al.*, 2013). Als Proben für die 16S-rDNA Amplicon Sequenzierung wurden PCR-Produkte nach der Amplifikation basierend auf der Primerpaarung Bact\_341F/Bact\_805R (#1610/1611) eingesetzt. Gesamt-Genomanalysen erfolgten aus isolierter DNA von Flüssigproben angereicherter Bakterienkultur.

Das Protokoll für Amplicon Sequenzierungen beinhaltete die Cluster-Generierung durch Brücken-Amplifikation, sowie Sequenzierung mittels „MiSeq next generation sequencing system“ und unter der Verwendung des „MiSeq reagent kit 500 cycles v2“ (*Illumina Inc.*, San Diego - USA). Basierend auf dem *sequencing by synthesis* (SBS) Ansatz (Fuller *et al.*, 2009), wurden 2x 250 bp Reads sequenziert (*paired-end* - durch bidirektionale Sequenzierung). Signalverarbeitung, Qualitätskontrolle und Kürzung von Adaptersequenzen wurde von *IMG M Laboratories* mit der Software „MiSeq Reporter 2.5.1.3“ durchgeführt.

Metagenomsequenzierungen isolierter DNA erfolgten nach gleichem Protokoll unter Verwendung des „NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit“ (*Illumina*). Sequenziert wurden 2x 150 bp mit einer erwarteten Abdeckung von mindestens 20 Millionen Reads pro Probe.

Alle weiteren im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten bioinformatischen Arbeiten erfolgten mit der Software „CLC Main Workbench“ und „CLC Genomic Workbench“ (*Qiagen*, Hilden - Deutschland) (s. auch Griebmeier *et al.*, 2017).

## 2.7 Mikroskopische Analysen

Der Aufbau des mikrofluidischen Chips (s. auch 2.1.1 / 2.1.2) ermöglichte die direkte, nicht-invasive Analyse kultivierter Biofilme mittels Mikroskopie.

Optische Auswertungen erfolgten per Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie. Fluoreszenzmikroskopische Analysen basierten auf der molekularbiologischen Färbung durch FISH (s. auch 2.2.1). Alle in dieser Arbeit verwendeten Mikroskope, inklusive integrierter Kameraeinheiten und Software, stammten von der Firma *Leica Microsystems* (Wetzlar - Deutschland). Für phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen wurde das Modell DM750 mit integrierter Kameraeinheit ICC50 HD verwendet. Fluoreszenzmikroskopische Analysen wurden mit dem Modell DM5500 B (verwendete Objektive: HCX PL APO CS (63.0x/1,4 OIL) und HCX PL FLUOTAR (100.0x/1,3 OIL)) und der Steuerungssoftware Leica Application Suite (Advanced Fluorescence, Version 2.7.0.9329) durchgeführt.

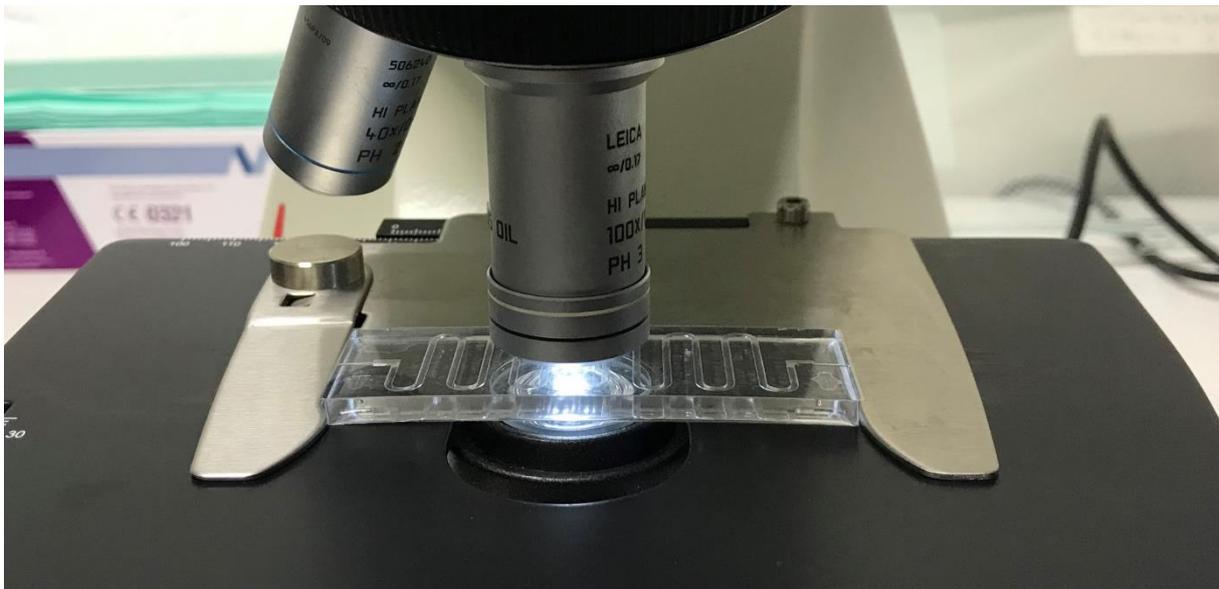


Abb. 17: Exemplarische Darstellung mikroskopischer Analyse eines mikrofluidischen Chips.

## 2.8 UV-Mutagenese

Auf Basis einer UV-Lampe wurde ein System zur Bestrahlung von Zellen innerhalb eines mikrofluidischen Chips etabliert. Ermöglicht wurde dies durch die Strahlungspermeabilität des für den Chipkörper verwendeten PDMS und einer angepassten Halterung zur Fixierung einer UV-Lampe.

Kernelement des neuen Mutagenese-Systems stellte eine UV-Lampe der Firma *Vilber Lourmat* (Eberhardzell - Deutschland) dar. Verwendet wurde das Modell VL-4.LC mit einer Leistung von 4 W und ausgestattet mit zwei Filtern zur Umschaltung zwischen 254 nm (UV-C) und 365 nm (UV-A). Eine angepasste Auflage zur freien Positionierung der Lampe konnte durch die Verwendung von Gewindestangen variabler Länge dazu genutzt werden den Abstand zwischen Chip und Lampe einzustellen. Die verwendeten Gewindestangen hatten die Maße eines metrischen M3-Gewindes und ermöglichten die Nutzung von Bohrungen der Basisplatte zur Positionierung der Chips (s. auch Abb. 18).

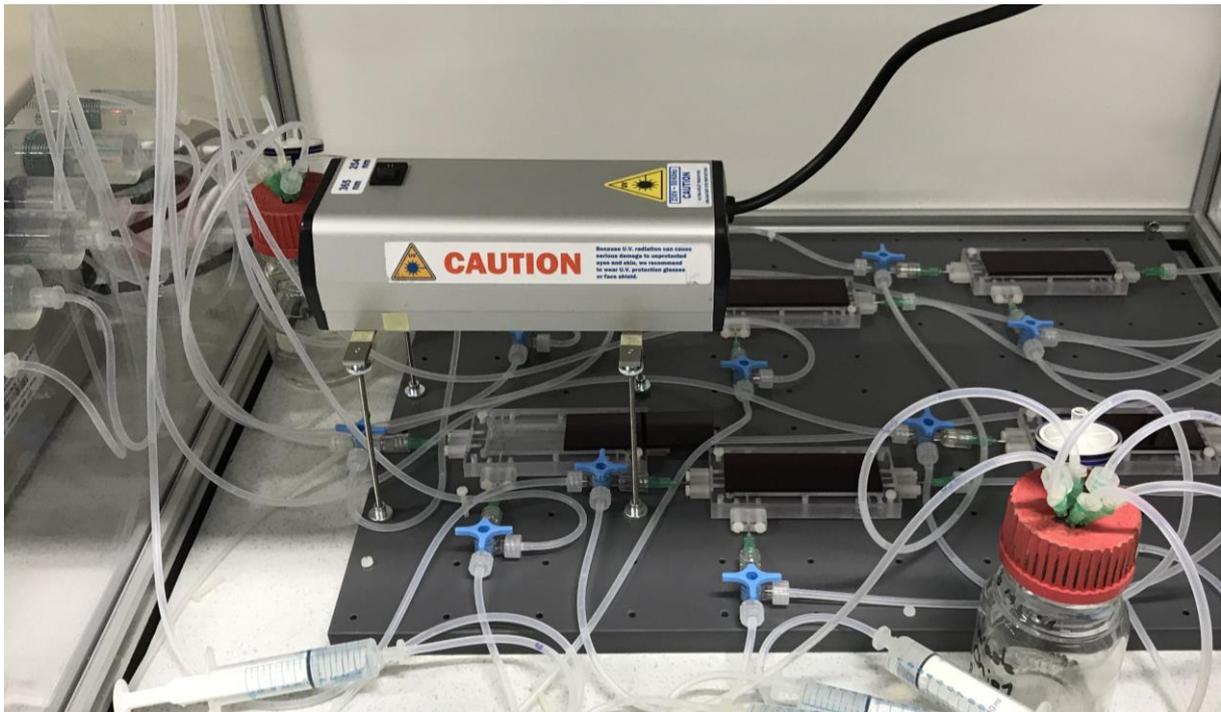


Abb. 18: Abbildung des Mutagenese-Systems mit UV-Lampe und einstellbarer Halterung. Durch die Verwendung metrischer Gewindestangen konnte die Halterung auf der Basisplatte passend zu den Positionierungen mikrofluidischer Chips verwendet werden.

In dieser Arbeit wurden alle Experimente mit dem Filter für 254 nm (UV-C Strahlung) und einem Abstand von 10 cm durchgeführt. Als Folge dessen basierte die unterschiedliche **Bestrahlung** [mJ/cm<sup>2</sup>] der angewandten UV-C Strahlung allein auf der Expositionsdauer.

Die im Chip ankommende **Intensität** [mW/cm<sup>2</sup>] lag, nach einer Reduktion durch die Wegstrecke von 10 cm und die Absorption durch 3 mm Silikon und 0,5 mm Medium (10 %iges LB, s. auch Tab. 10), zwischen 0,13 mW/cm<sup>2</sup> und 0,14 mW/cm<sup>2</sup>. Für Messungen der Intensität wurde ein UV-Radiometer (VLX-3W Version 3.0) mit Wechselsensor (CX-254) der Firma *Vilber Lourmat* verwendet. Als Wirkungsnachlass zum äußeren Bereich der Lampe, welcher bereits in vorangegangenen Arbeiten beschrieben wurde (Schieß, 2017; s. auch Abb. 19), ergab sich eine Reduktion auf bis zu 53% maximaler Intensität.

0,54	0,72	0,83	0,81	0,67
0,64	0,86	1,00	1,00	0,83
0,53	0,67	0,79	0,80	0,67

Abb. 19: Schematische Darstellung des Wirkungsbereichs der UV-Lampe. Gezeigt wird eine Unterteilung der bestrahlten Chipfläche in 15 gleichmäßige Bereiche. Daten entnommen aus Schieß (2017).

Unter Berücksichtigung des Wirkungsbereichs der Lampe und der Absorption durch das Chipmaterial (inklusive Medium) ergab sich für den gewählten Aufbau (10 cm Abstand, 254 nm Filter) eine Mindestintensität von 0,069 mW/cm<sup>2</sup>. Folgende Formel wurde zur Bestimmung der jeweils benötigten minimalen Expositionsdauer herangezogen:

$$\text{notige Exposition [s]} = \text{gewünschte Bestrahlung [mJ/cm}^2\text{]} / \text{Mindestintensität*}$$

\*entspricht in dieser Arbeit stets 0,069 mW/cm<sup>2</sup>

Nach Einschalten der Lampe bis zur Stabilisierung der Leistung ergab sich eine Wartezeit von 1 min. Zur Vermeidung von Leistungsschwankungen wurde deshalb vor jeder ersten Nutzung eine Warmlaufphase entsprechend dieser Zeitspanne durchgeführt. Aufgrund einer im Dauerbetrieb einsetzenden Leistungsreduzierung, wurde bei Experimenten mit mehreren Chips zwischen einzelnen Bestrahlungsphasen mindestens eine Pause von 5 min sowie eine erneute Warmlaufphase von 20 s durchgeführt. Um eine ungewollte Bestrahlung nicht zu bestrahlender Chips zu vermeiden, wurden diese bei Verwendung der UV-Lampe mit Polycarbonat-Platten abgedeckt (s. auch Abb. 18).

## 2.9 Reduktionsassay (96-Well)

Bakterielle Kapazitäten zur Reduzierung von Methylenblau wurden spektroskopisch anhand eines neu etablierten Assays im 96-Wellplattenmaßstab bestimmt. Dieser basierte auf dem Absorptionsmaximum oxidierten Methylenblaus bei 660 nm. Durch die Absorptionsabnahme bei 660 nm konnten Rückschlüsse auf die Reduktionskapazität unterschiedlicher Zellsuspensionen geschlossen werden. Die reaktionsbegleitende Auslesung optischer Dichten im Verlauf der Reduktionsreaktionen wurde mithilfe des Plattenlesegerätes M200Pro und der Steuersoftware „i-Control V2.0“ der Firma *Tecan* (Männedorf - Schweiz) ermöglicht. Um sauerstoffbedingte Rückoxidation zu vermeiden, fand der Assay unter anoxischen Bedingungen innerhalb einer sauerstofffreien Kammer statt („Vinyl Anaerobic Chamber“; *Coy Laboratory Products*, Grass Lake - USA).

Die Vorbereitung der verwendeten Vorkulturen starteten mit der Übernachtskultivierung der zu testenden Stämme (JG1395, JG1396 und JG1399) in Vollmedium (LB-Medium, 37 °C, 130 rpm). Alle für den Test relevanten Vorkultivierungen und Inkubationen erfolgten stets inklusive benötigter Antibiotika (Chloramphenicol und Kanamycin, s. auch Tab. 8). Übernachtskulturen wurden abzentrifugiert (2 min, 6000 g - Tischzentrifuge 5810 R; *Eppendorf*, Hamburg - Deutschland) in frischem LB-Medium aufgenommen, mit Arabinose und AHT (Endkonzentrationen: 100 µM und 0,43 µM) induziert und für weitere 4 h bei 37 °C und 130 rpm kultiviert. Die Kulturen wurden im Anschluss erneut abzentrifugiert, mit einer  $OD_{600} = 3$  in Adaptionmedium (s. Tab. 32) aufgenommen und für weitere 18 h unter Ausschluss von Sauerstoff inkubiert (sauerstofffreie Kammer). Die Zellen wurden final zweimal mit Testmedium (entspricht Adaptionmedium ohne Elektronenakzeptoren) gewaschen und im selben Volumen aufgenommen.

Zum Start der Reaktion wurden 100 µl vorbereiteter Zellsuspensionen in 100 µl vorgelegte Testlösung (s. auch Tab. 33) pipettiert. Die Absorptionmessung startete mit Zugabe der Zellen. Messintervalle betragen 10 s, die Reaktionskinetik wurde für insgesamt 15 min aufgezeichnet. Um Zell/Testlösung-Suspensionen mit Endkonzentrationen von 1 µM / 3,125 µM / 6,25 µM / 12,5 µM sowie 25 µM Methylenblau zu ermöglichen, wurden die Testlösungen doppeltkonzentriert vorgelegt. Alle Ansätze erfolgten in technisch unabhängigen Triplikaten. Parallele zellfreie Ansätze sowie Ansätze ohne Methylenblau dienten als Kontrolle für die eingesetzten Zellmengen und zur Bestimmung des zu verrechnenden Nullwertes.

Tab. 32: Zusammensetzung des Adaptionsmedium (Reduktionsassay).

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>	<b>Endkonzentration</b>
M9-Salze (5x)	200 ml	<i>Ix</i>
CaCl <sub>2</sub> -Lösung [0,1 M]	1 ml	0,1 mM
MgSO <sub>4</sub> -Lösung [0,5 M]	2 ml	1 mM
Glucose-Lösung [1 M]	10 ml	10 mM
DMSO	2,84 ml	40 mM
<b>Antibiotika</b>		
Kanamycin-Stock [50 mg/ml]	1 ml	50 µg/ml
Chloramphenicol-Stock [30 mg/ml]	1 ml	30 µg/ml
<b>Induktion</b>		
AHT-Stock [4,3 mM]	100 µl	0,43 µM
Arabinose-Stock [0,5 M]	200 µl	100 µM

*ad 1000 ml (ddH<sub>2</sub>O)*

Tab. 33: Zusammensetzung der Testlösung (Reduktionsassay).

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>	<b>Endkonzentration</b>
M9-Salze (5x)	200 ml	<i>Ix</i>
CaCl <sub>2</sub> -Lösung [0,1 M]	1 ml	0,1 mM
MgSO <sub>4</sub> -Lösung [0,5 M]	2 ml	1 mM
<b>variabel:</b>		
Methylenblau-Stock [50 mM]	<i>40 µl</i>	<b>2 µM</b>
	<i>125 µl</i>	<b>6,25 µM</b>
	<i>250 µl</i>	<b>12,5 µM</b>
	<i>500 µl</i>	<b>25 µM</b>
	<i>1000 µl</i>	<b>50 µM</b>

*ad 1000 ml (ddH<sub>2</sub>O)*

## 2.10 Bioelektrochemische Systeme

Zur Bestimmung von Stromproduktionsraten wurden bioelektrochemische Systeme nach Förster *et al.* (2017) verwendet (s. auch Abb. 20). Aufbau, Vorbereitung und Handhabung der Systeme erfolgten nach Angaben der Autoren.

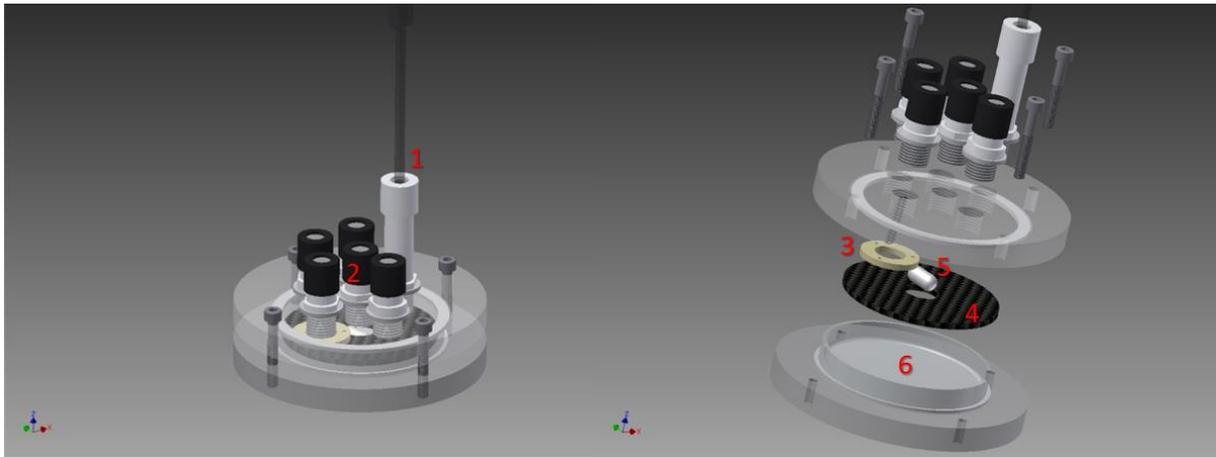


Abb. 20: Technische Zeichnung verwendeter bioelektrochemischer Reaktorsysteme. In Rot: 1 = Halterung (inklusive Darstellung) der Referenzelektrode; 2 = Anschlüsse mit Septen (5x); 3 = ringförmiges Kathodenkompartiment; 4 = Anode (40 cm<sup>2</sup> zugeschnittenes Graphitfilz); 5 = zentraler Rührfisch; 6 = Anodenkompartiment/Kultivierungskammer mit einem Gesamtvolumen von 23 ml (Förster *et al.*, 2017).

Als Arbeitselektrode (Anode) wurde Graphitfilz (Sigracell; *SGL Carbon*, Wiesbaden - Deutschland) mit einer Fläche von 40 cm<sup>2</sup> pro Reaktor eingesetzt. Als Referenz wurde eine Silber-Silberchlorid-Elektrode verwendet (alle späteren Angaben zur Potentialdifferenz erfolgen gegen das Standardpotential einer Normal-Wasserstoffelektrode (NHE)). Brennstoffzellen wurden einzeln über separate Potentiostaten (Modell: WaveNow USB) sowie die Software AfterMath (Version 1.4.8245) der Firma *Pine Research Instrumentation* (Durham - USA) gesteuert. Alle Brennstoffzellenexperimente wurden unter strikt anoxischen Bedingungen durchgeführt (sauerstofffreie Kammer - „Vinyl Anaerobic Chamber“; *Coy Laboratory Products*, Grass Lake - USA).

Zur Überwachung von pH-Abweichungen umfassten parallele Ansätze stets ein Replikat mit zusätzlich integrierter pH-Elektrode (Elektrode: pHenomenal 211 / Messgerät: pH 1000 L; *VWR*, Leuven - Belgien). Kontrollen erfolgten stündlich in den ersten 9 h des Experimentverlaufs, mit einem Sollbereich von pH = 7,2 - 7,4. Nachjustiert wurde mit steriler

NaOH- [1 M] beziehungsweise HCl-Lösung [1 M]. Vor jedem Potentialwechsel wurde der pH-Wert neu justiert und die Stromproduktion für weitere 15 min auf ihre Stabilität kontrolliert.

In Brennstoffzellen eingesetzte Bakterien wurden wie in Abschnitt 2.9 beschrieben vorbereitet. Abweichend von der Vorbereitung für Zellen des Reduktionsassays erfolgte bereits nach zweiter Kultivierung in Vollmedium die finale Aufnahme in MFC-Medium (s. auch Tab. 14, Waschlösung entsprach Medium ohne Glucose). Als finale Zellkonzentration wurde eine  $OD_{600}$  von 6 eingestellt. Pro Brennstoffzelle wurden 23 ml Zellsuspension eingesetzt.

### 3. Ergebnisse

Im Fokus dieser Arbeit stand die multifaktorielle Analyse eines neuen mikrofluidischen Chipsystems und dessen Anwendbarkeit als Biofilmkultivierungsplattform. Anhand von Monospezies-Kultivierungen erfolgte zunächst eine Beschreibung der Biofilmbildung mit gesondertem Augenmerk auf Auswirkungen durch neuentwickelte Prozessprotokolle (I). Neben der Darstellung von Biofilmen wurde auch die Kapazität einer gerichteten Ausbildung biologischer Gradienten untersucht. Zentrale Frage war die Separierung nativer dreidimensionaler Biofilmstrukturen in eine zweidimensionale, über den Kanal verlaufende Auftrennung. Dies wurde durch Experimente zur Nischenbesetzung anhand eines physikalisch induzierten Sauerstoffgradienten (II) und der Co-Kultivierung unter Chromstress (III) validiert. Beide Versuche umfassten Co-Kultivierungen synthetischer, mikrobieller Konsortien in welchen sich die jeweiligen Organismen aufgrund ihrer physiologischen Charakteristik in unterschiedlichen Bereichen der mikrofluidischen Struktur ansiedeln sollten. Das zweite Co-Kultivierungsmodell diente ergänzend dazu als *Proof of Concept* zur Validierung einer robotergestützten Probenahme als Hilfsmittel räumlich aufgelöster Analysen mittels moderner Sequenzierungstechniken (*next generation sequencing*; NGS). Als Erweiterung der Validierungsexperimente wurden in dieser Arbeit ebenfalls erste technische Anwendungsmöglichkeiten des fluidischen Chipsystems getestet. Diese umfassten Experimente zur Analyse kultivierter Biofilme unter dem initialen Einfluss von UV-C-Strahlung (IV) und die Nutzung des Chipsystems als Zuchtplattform zur Generierung neuer biotechnologisch nutzbarer Stämme (V).

#### 3.1 Allgemeine Beschreibung des Systems

Als erstes Experiment zur Untersuchung der Biofilmbildung innerhalb des Chipsystems wurde ein mit *Micrococcus luteus* inokulierter Chip zeitlich aufgelöst per Phasenkontrastmikroskopie untersucht. Die Kultivierung erfolgte unter oxidischen Bedingungen mit Glucose-basiertem Minimalmedium. Alle Ergebnisse beobachteter Biofilmentwicklung sind in Abbildung 21 zusammengefasst. Aufnahmen wurden zu vier verschiedenen Zeitpunkten an identischen Punkten innerhalb des fluidischen Kanals gemacht. Der Zeitpunkt  $t_1$  entspricht dabei der Phase unmittelbar nach der Inokulation mit *M. luteus*. Weitere Aufnahmen erfolgten nach 26,5 h ( $t_2$ ), 45 h ( $t_3$ ) und 73 h ( $t_4$ ). Die dokumentierten Positionen wurden so gewählt, dass

repräsentative Beobachtungen für den vorderen (A), mittleren (B) und hinteren (C) Bereich des Kanals gemacht werden konnten (s. auch Abb. 21). Für die Phase direkt nach der Inokulation ( $t_1$ ) zeigte sich eine gleichförmige Verteilung sedimentierter Zellen in allen Bereichen des Kanals. Ab dem Zeitpunkt  $t_2$  konnte die Ausbildung von Biofilm in allen Teilen des Chips dokumentiert werden, wobei die Dichte der neuentstandenen Biomasse über den Verlauf des Kanals abnahm. Die Bereiche B und C zeigten zu späteren Zeitpunkten keine weitere Zunahme der Biofilmdichte. Im hinteren Abschnitt wurde nach 73 h eine leichte Abnahme der Biomasse beobachtet. Im Vergleich dazu zeigte sich für die vorderen Abschnitte des Chips eine stetige Zunahme der Biofilmdichte über die Zeit.

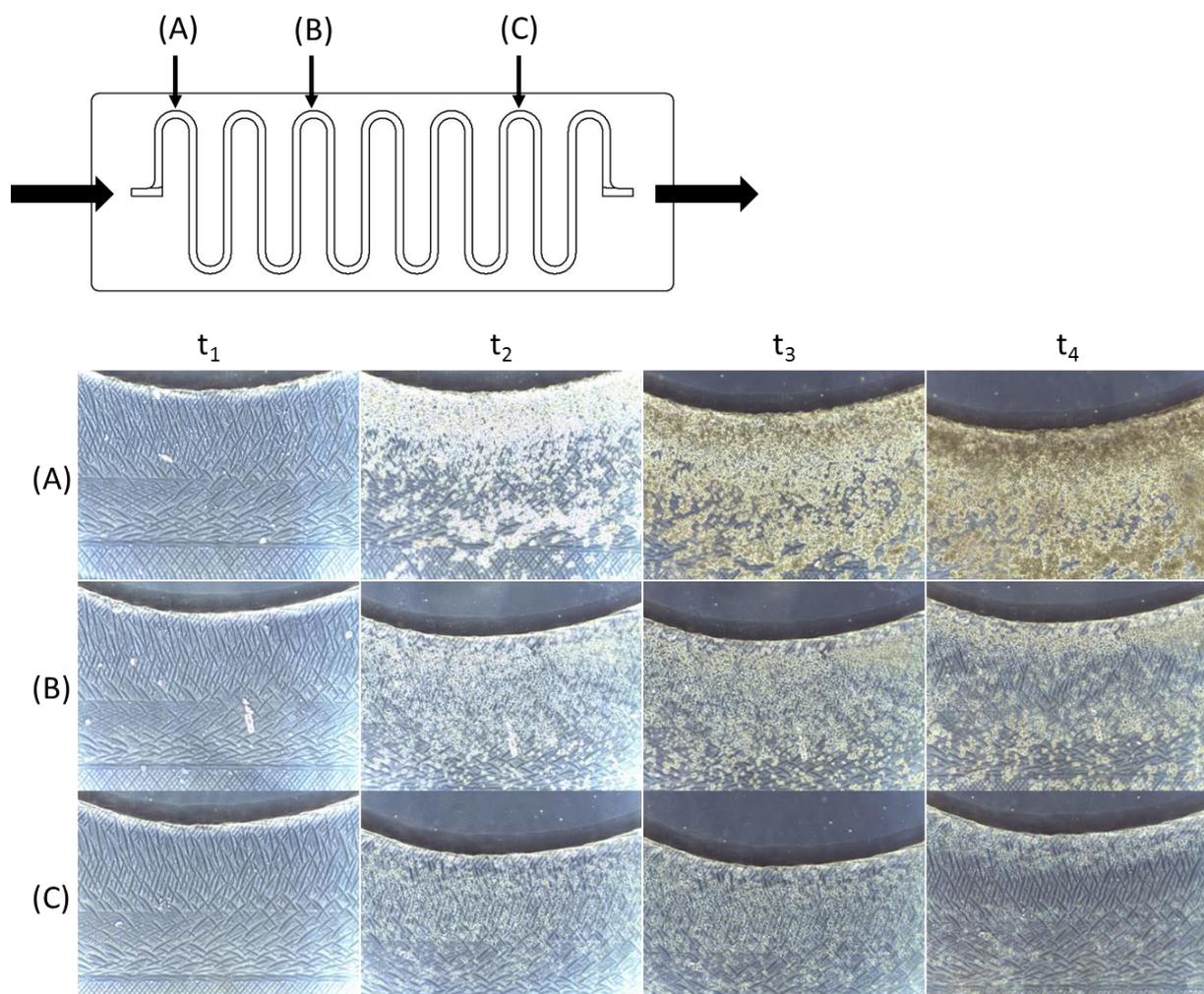


Abb. 21: Zeitliche Aufnahmen verschiedener Chipsektionen eines mit *Micrococcus luteus* kultivierten Chips. Im oberen Abschnitt der Abbildung zeigt ein Schema des Chips die observierten Regionen (A, B und C) in Bezug zur Fließrichtung des Mediums (dicke schwarze Pfeile). Die Biofilmbildung wurde zu den Zeitpunkten  $t_1$  (0 h),  $t_2$  (26,5 h),  $t_3$  (45 h) und  $t_4$  (73 h) dokumentiert. Die deutlichste Veränderung der Zelldichte wurde ab  $t_2$  in Abschnitt A des Chips beobachtet. Im hinteren Teil des mikrofluidischen Kanals wurde ab 26,5 h keine weitere Zunahme der Biomasse festgestellt. Alle Aufnahmen erfolgten im Phasenkontrast bei 100facher Vergrößerung.

Zusammenfassend zeigte sich in diesem Experiment, basierend auf einer zeitlich bedingten und räumlich unterschiedlichen Zunahme der Biomasse, die Ausbildung eines Dichtegradienten Chip-kultivierter Biofilme.

Eine weitere Charakteristik der Chip-Kultivierung wurde ebenfalls per Mono-Kultivierung von *M. luteus* in Kombination mit Phasenkontrastmikroskopie beobachtet und ist exemplarisch in Abbildung 22 dargestellt. Die mikroskopischen Beobachtungen ergaben eine auffällig höhere Biofilmdichte auf jeweils einer spezifischen Kanalseite. Dieses Phänomen zeigte sich in unterschiedlicher Intensität in allen Experimenten und blieb in den meisten Versuchen über den gesamten Verlauf des mikrofluidischen Kanals konstant. Im Bezug zur Fließrichtung des Mediums fanden sich diese dichteren Biofilmbereiche immer auf jener Seite, zu welcher auch der Inokulationszugang im Verhältnis zur Fließrichtung vorzufinden war.

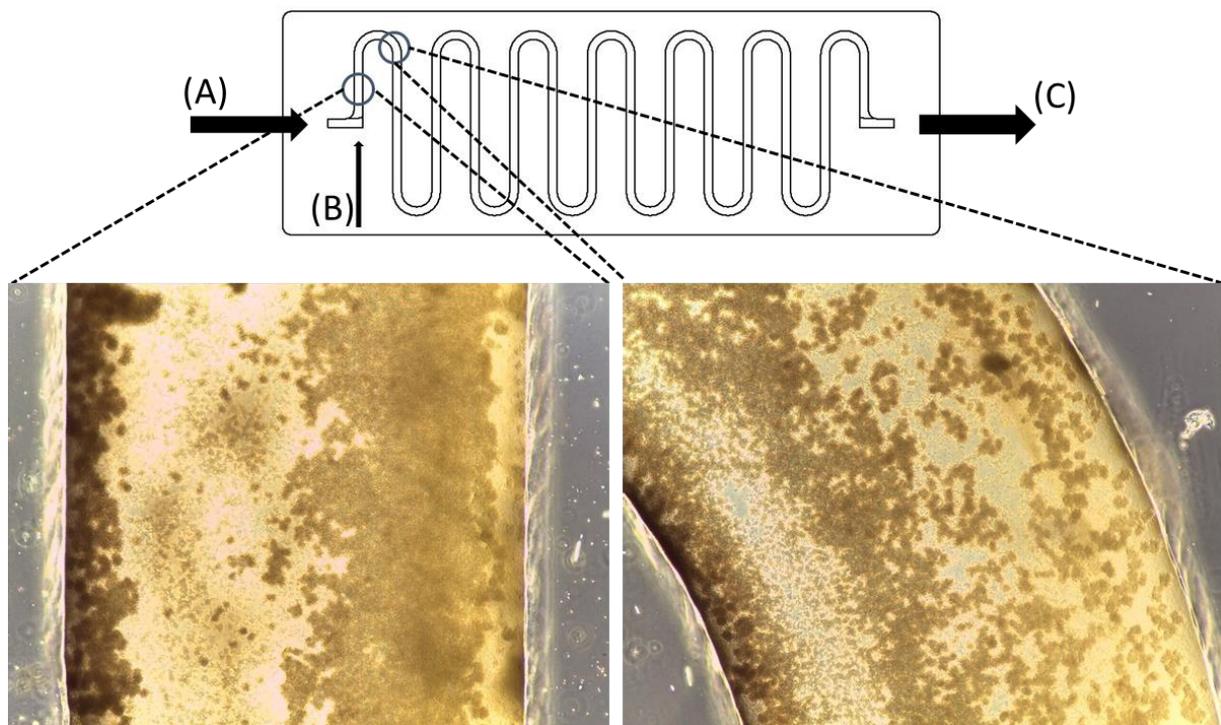


Abb. 22: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen aus einem mit *M. luteus* kultiviertem Chip. Die Bilder zeigen einen Unterschied des Biomasseanteils in Bezug zur Kanalseite. Der obere Bildabschnitt zeigt die schematische Darstellung des Chips mit den observierten Regionen in Bezug zum Mediumszufluss (A), Inokulationszufluss (B) und Abfluss (C). Aufnahmen wurden mit 100facher Vergrößerung aufgenommen. Die Breite des Kanals betrug gleichmäßig 1 mm.

### 3.2 Sauerstoff-bedingte Nischenbesetzung

Anhand qualitativer Beobachtungen aus verschiedenen Mono-Kultivierungen von *Micrococcus luteus* konnte eine allgemeine Beschreibung der Biofilmbildung innerhalb des mikrofluidischen Chipsystem dargestellt werden. Zur Validierung der Ausbildung biologischer Gradienten, welche als Grundvoraussetzung für die angestrebte zweidimensionale Auftrennung vorausgesetzt werden kann, wurden Co-Kultivierungsexperimente mit *Micrococcus luteus* und *Pseudomonas brassicacearum* durchgeführt.

Die Kombination aus der Verwendung eines oxischen Mediums, der hohen Gasdurchlässigkeit der PDMS-Chips und anoxischen Bedingungen innerhalb der Kultivierungskammern des Chipsystems erlaubte die Darstellung eines über den Verlauf des mikrofluidischen Kanals abnehmenden Sauerstoffgradienten. Die anoxische Atmosphäre um die Chips wurde durch eine permanente Begasung mit Stickstoff ermöglicht. Abhängig von physiologischen Eigenschaften beider Mikroorganismen sollte sich analog zu dem Sauerstoffgradienten ebenfalls die biologische Zusammensetzung des Biofilms über den Verlauf des Kanals verändern. Da es sich bei *M. luteus* um einen obligat aeroben Organismus handelt, wurde erwartet, dass sich dieser bei Ausbildung des Gradienten nur in den vorderen Abschnitten des Chipsystems finden lassen würde. *P. brassicacearum* ist neben der aeroben Atmung auch zur Denitrifikation fähig, damit fakultativ anaerob und es wurde erwartet den Stamm in allen Bereichen des Kanals vorzufinden.

Die Co-Kultur wurde mit Minimalmedium in Chips mit und ohne Stickstoffbegasung kultiviert (s. auch Tab. 23, Abschnitt 2.5.3). Nach drei Tagen wurde der Biofilm mittels automatisierter FISH (s. auch Abschnitt 2.2.1) markiert und die Zusammensetzung des Biofilms über den Verlauf des Kanals fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Alle Ergebnisse zum *M. luteus* / *P. brassicacearum*-Konsortium sind in Abbildung 23 zusammengefasst.

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung von Co-Kulturen oxischer Chips zeigte über den gesamten Kanal eine ähnliche Zusammensetzung beider Mikroorganismen (s. (B) in Abb. 23). Rot-gefärbte *M. luteus*-Zellen, ebenfalls an der Ausbildung von Tetraden erkennbar, fanden sich in allen observierten Bereichen des Chips und wiesen auch in den hinteren Abschnitten ein deutliches, durch die Spezifität der Sonden bedingtes Fluoreszenzsignal auf. Ein ähnliches Bild ergab sich für die Stäbchen-förmigen *P. brassicacearum*-Zellen (grüne Fluoreszenz), wobei über den Verlauf des Kanals eine vermehrte Verkettung der Zellen beobachtet werden konnte.

Chip-Kultivierungen unter Einfluss einer Stickstoffatmosphäre (anoxisch) zeigten ebenfalls die erfolgreiche Kultivierung beider Organismen innerhalb des mikrofluidischen Systems (s. (A) in Abb. 23). Hierbei fanden sich Sonden-markierte *M. luteus*-Zellen (rote Fluoreszenz)

allerdings nur etwa bis zur vierten Windung des mäanderförmigen Kanals. Diese Beobachtung ist eine Annäherung aus mehreren Replikaten, in welchen sich abhängig vom Replikat noch vereinzelt rot-gefärbte Zellen bis zur maximal sechsten Windung des Kanals finden ließen. Unter Vernachlässigung dieser Einzelzellen lässt sich die Zone in welcher *M. luteus* kultiviert werden konnte auf die ersten 45 µl\* des Chipvolumens kalkulieren. In allen Teilen der Chips wurden zusätzlich zu den mit Sonden hybridisierten Zellen auch vereinzelt nur mit DAPI gefärbte Tetraden gefunden.

*P. brassicacearum* wuchs, wie auch bereits für den nicht begasten Aufbau beschrieben, über den gesamten Bereich des fluidischen Kanals und es wurden in jedem Kanalabschnitt sowohl unspezifisch mit DAPI gefärbte, als auch Sonden-markierte Zellen gefunden. Das Verhältnis beider Organismen zueinander variierte abhängig der gewählten Kultivierungsbedingungen. Chips ohne induzierten Sauerstoffgradient wiesen in allen Fällen einen größeren Anteil an *M. luteus* auf, als Kultivierungen mit permanenter Stickstoffbegasung. Dies traf auch für die hintersten Bereiche des Kanals zu. Im Allgemeinen waren begaste Chips weniger dicht mit Biofilm bewachsen.

\*[Gerechnet wurde mit einem Gesamt-Kanalvolumen (ohne Vorkammern) von 148,45 µl. Dies lässt sich in 13 gleichgroße Teile zerlegen, welche jeweils einer Windung oder Kurve des Mäanders plus zwei halbe Längen eines geraden Kanalabschnittes entsprechen. Jeder dieser Teile umfasst damit 11,42 µl. Will man das Chipvolumen bis zum Ende der 4. Windung berechnen kalkuliert man mit 3½ dieser Chipteile und addiert das Volumen der Vorkammer von 5,36 µl dazu. Dies entspricht 45,33 µl]

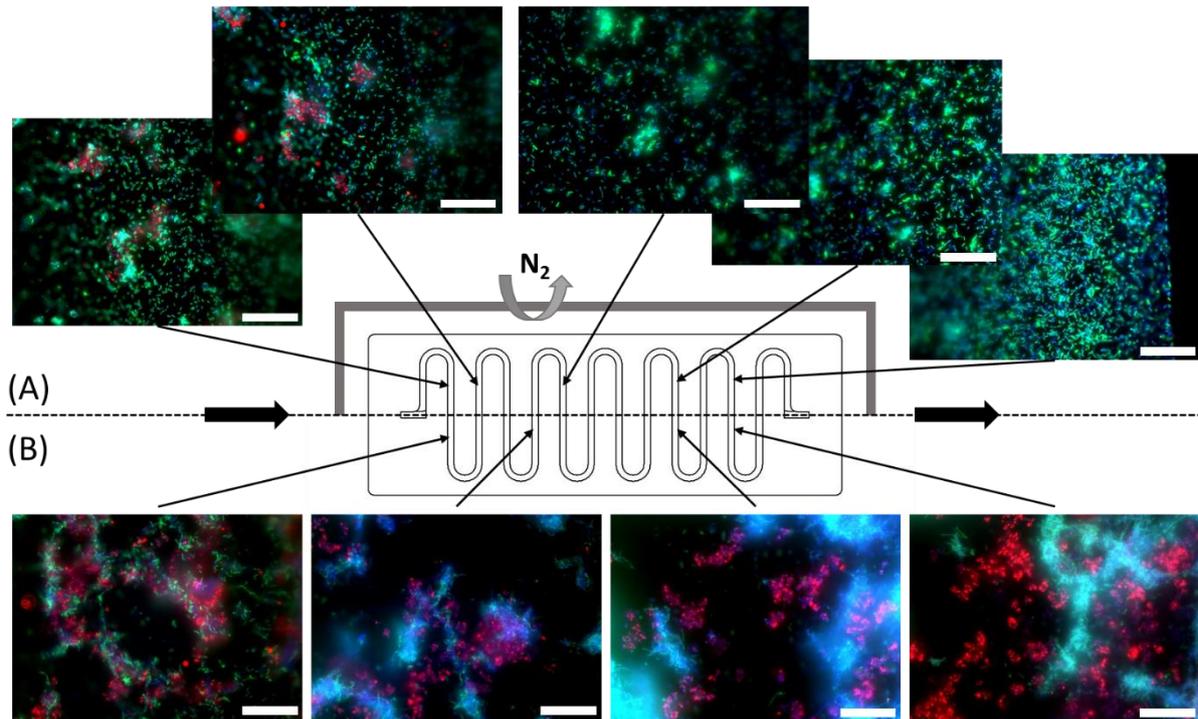


Abb. 23: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen aus *M. luteus* / *P. brassicacearum* Co-Kulturexperimenten. Gezeigt werden Bilder aus Chip-Sets mit Sauerstoffgradient (A) und unter nicht begasten Kultivierungsbedingungen (B). Die Fließrichtung des Mediums ist schematisch mit schwarzen Pfeilen angezeigt. Alle Aufnahmen wurden mit 630facher Vergrößerung aufgenommen, Größenbalken 50  $\mu\text{m}$ . Sondenfärbung in Rot: HGC69a(Atto550); Grün: Gam42a(FITC); Blau: DAPI-Gegenfärbung.

### 3.3 Toxizitäts-bedingte Auftrennung

Zur weiteren Validierung der zweidimensionalen Auftrennung wurde ein zweites 2-Spezies-basiertes Co-Kultur Modell, bestehend aus *Leucobacter chromiirestiens* und *Escherichia coli* etabliert. Unter Zuhilfenahme dieses Modells sollte ebenfalls überprüft werden, ob mittels der robotergestützten Probenahme auch weiterführende Analysen durch moderne Sequenzierungstechnologien durchgeführt werden könnten.

Die Idee zur Auftrennung des Konsortiums basierte auf der hohen Schwermetalltoleranz von *L. chromiirestiens*. Da dessen Resistenzmechanismen unter anderem auch die Reduktion von Chrom(VI) zum weniger löslichen und damit weniger toxischen Chrom(III) beinhaltet, bestand die Annahme, dass es dem Organismus möglich sein müsste in einem unter Chromstress anwachsenden Biofilm eine Nische für weniger tolerante Organismen ausbilden zu können. Basierend auf dem Prinzip der räumlichen Auftrennung von Biofilmgemeinschaften durch die Verwendung des Chips, sollte sich diese Nischenbildung über den Verlauf des Kanals abbilden lassen können.

#### 3.3.1 Vorexperimente zur Chrom(VI)-Toleranz von *E. coli* K12

Zur Bestimmung der Chrom(VI)-Toleranz von *E. coli* wurden parallele Wachstumsversuche im 96-Wellplattenmaßstab mit LB ergänzt um unterschiedliche Chromkonzentrationen (0 - 2,5 mM, s. auch Abschnitt 2.5.5) durchgeführt. Die Messung der optischen Dichte erfolgte täglich bei einer Wellenlänge von 600 nm. Abbildung 24 stellt eine graphische Zusammenfassung der gemessenen Absorptionswerte aller Ansätze dar. Die Wachstumsversuche zeigten eine eindeutige Abnahme der Wachstumsraten mit Zunahme der Chrom(VI)-Konzentration. Innerhalb des Experimentzeitraums von 100 h wurde in Anwesenheit von 2,5 mM Chrom(VI) kein signifikantes Wachstum detektiert, wohingegen ohne den Zusatz des toxischen Schwermetalls nach dieser Zeit bereits eine Abnahme der optischen Dichte zu beobachten war. Als Kontrolle dienten zellfreie Ansätze auf der gleichen Platte. Innerhalb der dokumentierten 100 h wurde dabei keine Veränderung der optischen Dichte festgestellt.

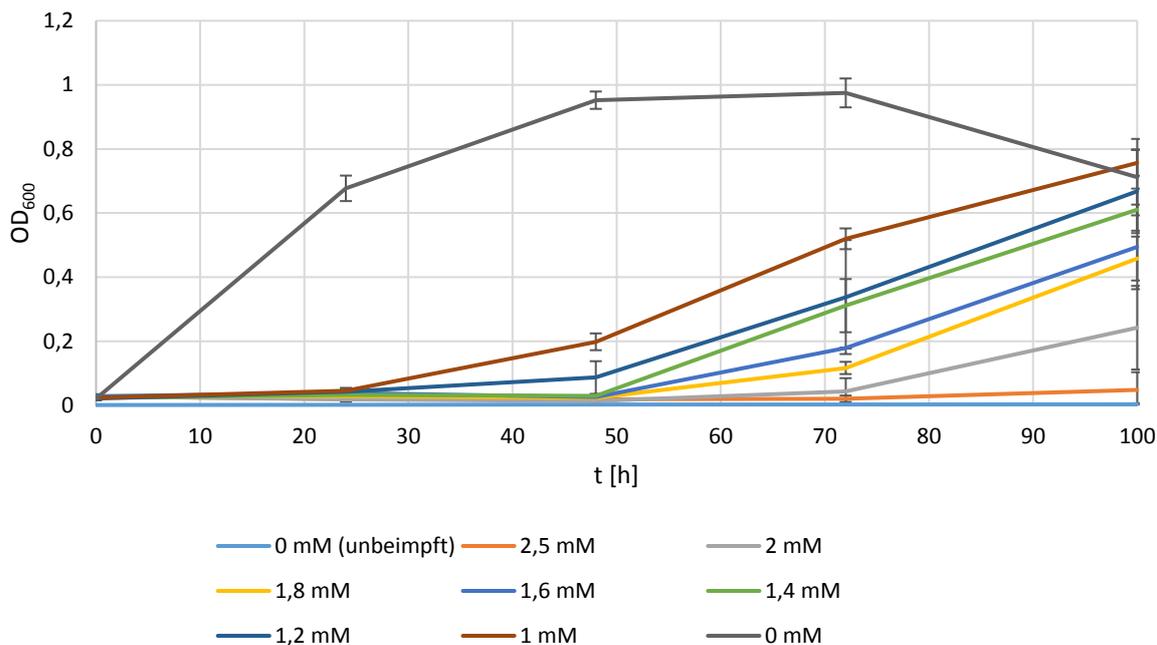


Abb. 24: Graphische Darstellung des Wachstumsverhaltens von *E. coli* K12 in Anwesenheit von Chrom(VI). Aufgetragen ist die optische Dichte bei 600 nm gegen die Zeit. Kultivierungen erfolgten im Replikat mit fünf Ansätzen pro Konzentration.

Aus diesen Experimenten resultierte ein kritischer toxischer Einfluss von Chrom(VI) ab 2,5 mM, wodurch die letale Dosis für die nachfolgenden Chipexperimente auf 3 mM angesetzt wurde. Der prognostizierte toxische Effekt sollte durch Chip-Monokultivierungen mit *E. coli* verifiziert werden. Replikate wurden für 9 Tage oxisch mit LB und 3 mM Chrom(VI) kultiviert. Die Analyse erfolgte per automatisierter FISH unter Verwendung der Sondenkombination, welche in späteren Experimenten zur Untersuchung der Co-Kulturexperimente verwendet wurde (s. auch Tab. 2, Abschnitt 2.2.1) und der Auswertung per Fluoreszenzmikroskopie (s. Abb. 25). In keinem Chip konnte die eindeutige Ausbildung eines Biofilms ausgemacht werden. Nur bei einzelnen Zellen oder Zell-ähnlichen Strukturen wurde eine Markierung durch die verwendeten Sonden beobachtet. Daher erfolgte die weitere Auswertung über die Fluoreszenz der unspezifischen DAPI-Gegenfärbung. Hierbei wurden nur sporadisch Zellen mit der für *E. coli*-typischen Morphologie von ungefähr 1  $\mu\text{m}$  auf 2  $\mu\text{m}$  langen Stäbchen ausgemacht. Stattdessen fanden sich vermehrt lange, mit Einzelfällen von über 50  $\mu\text{m}$  Länge, aber auch vernetzte Strukturen, sowie kleinere ca. 10 - 100  $\mu\text{m}$  große Spots unscharfer DAPI-Signale.

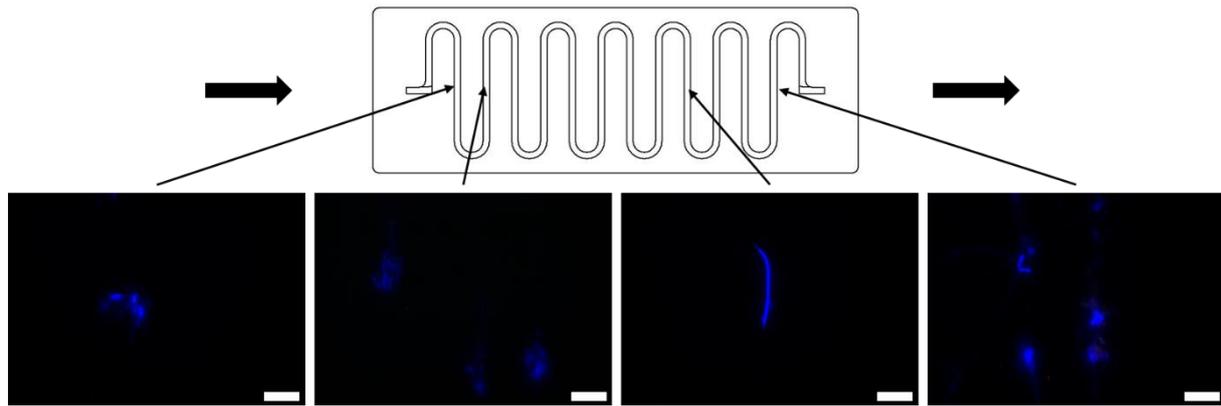


Abb. 25: Aufnahmen aus mit *E. coli* kultivierten Chips unter Chromstress. Schwarze Pfeile veranschaulichen die Fließrichtung des Mediums während der Kultivierung. Alle Aufnahmen wurden mit 1000facher Vergrößerung aufgenommen, Größenbalken 20  $\mu\text{m}$ . (rot: HGC69a; grün: Ent; blau: DAPI-Gegenfärbung).

### 3.3.2 Co-Kulturrexperimente mit Chrom(VI)

Die Co-Kultivierung zur Validierung der zweidimensionalen Auftrennung und zum Test der robotergestützten Probenahme umfasste acht Chips (s. auch Abb. 26), welche in Duplikaten (Replikate I und II) ohne bzw. mit 1 mM, 2 mM beziehungsweise 3 mM Chrom(VI) kultiviert wurden (s. auch Tab. 23, Abschnitt 2.5.3). Nach 7 Tagen Kultivierung wurden jedem Chip bei laufender Kultivierung jeweils 10  $\mu\text{l}$  aus dem vorderen (V) und hinteren (H) Teil des Kanals entnommen (s. auch Abb. 27)\*.

Da diese Proben ohne vorherige DNA-Extraktion direkt per 16S-rDNA Amplicon Sequenzierung analysiert werden sollten, wurde in einem Vorversuch geprüft, ob das im Medium enthaltene Chrom einen Einfluss auf die nachfolgende Amplifikation der DNA ausübt.

\*[Rechnung - bei 2,5  $\mu\text{l}/\text{min}$  Kultivierungsgeschwindigkeit, 20  $\mu\text{l}/\text{min}$  Ziehgeschwindigkeit der Probenahme und 10  $\mu\text{l}$  Probevolumen (30 s Probenahme). Für den Zeitraum der Probenahme wurden 1,25  $\mu\text{l}$  Medium von der Spritzenpumpe nachgeliefert, was ein Restvolumen von 8,75  $\mu\text{l}$  ergibt. Kalkuliert man mit einem gleichmäßigen Einzug aus beiden Richtungen des Kanalverlaufs ergibt sich der „Einzugsbereich“ der Probenahme von ca. 4,38  $\mu\text{l}$  vor und nach der Einstichstelle der robotergesteuerten Kanüle. Unter Rücksichtnahme der Kanalgeometrie (0,5 mm hoch und 1 mm breit) bedingt das, einen Kanalbereich von 8,75 mm vor und nach der Einstichstelle inklusive Zutrag aus dem Mediumsfluss]

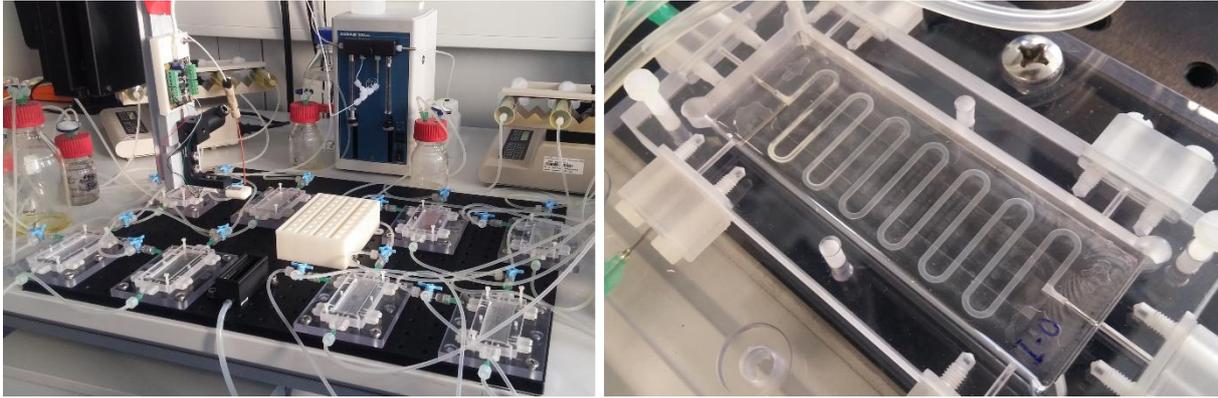


Abb. 26: Aufnahmen des Aufbaus des *E. coli* / *L. chromiirensis* Co-Kulturrexperiments.

Eine PCR mit verdünnten und unverdünnten Proben aus Chips unterschiedlicher Chrom(VI)-Konzentrationen wurde analog zum ersten Schritt des Sequenzierungsablaufs durchgeführt (Amplifikation der Ziel-DNA mit kombinierter Verlängerung durch die notwendigen Adaptoren). Dabei zeigte sich, dass die beste Ausbeute durch die Verwendung nicht verdünnter Proben erreicht wurde (s. auch Abschnitt 6.2). Es zeigten sich ebenfalls Banden bei der Verwendung verdünnter Proben, allerdings mit einem deutlich schwächeren Signal als mit der unverdünnten Probe. Auch bei verdünnten Ansätzen aus höherer Chromkonzentration konnte noch eine Amplifikation der Ziel-DNA nachgewiesen werden.

Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass für die eigentliche Sequenzierung alle Proben ebenfalls unverdünnt verwendet wurden. Als zusätzliche Kontrolle wurde die Verlängerung der Zielsequenz um die benötigten Adaptoren selbst durchgeführt. Dies war für alle Ansätze erfolgreich (s. auch Abschnitt 6.2), worauf die adaptierten Fragmente aus dem Gel aufgereinigt und die DNA-Konzentrationen der Proben per Nanodrop (Mikrovolumen-Spektralphotometer) quantifiziert wurden. Alle weiteren Sequenzierungsschritte erfolgten extern durch die Firma *IMG*M (Martinsried - Deutschland).

Resultierende Reads wurden gegen eine speziell erstellte „2-Spezies-Datenbank“ bestehend aus den Consensus-Sequenzen der 16S-rDNA beider Organismen des Co-Kulturmodells verglichen. Dies führte zu einer Zuordnung zu entweder *L. chromiirensis* oder *E. coli*. Für die Darstellung der realen Verhältnisse beider Organismen wurde die spezifische Zahl der 16S-rDNA-Kopien (sieben Kopien im Genom von *E. coli* und drei bei *L. chromiirensis*) auf die zugeordneten Reads verrechnet. Aus den so normalisierten Daten konnte nun für jede einzelne Probe das Verhältnis von *E. coli* zu *L. chromiirensis* bestimmt werden (s. Abb. 27). Dabei ergab sich für Chips, welche ohne die Zugabe von Chrom(VI) kultiviert wurden, sowohl für die

vorderen als auch für die hinteren Bereiche eine vollständige Zuordnung aller Reads zu *E. coli*. Für Kultivierungen mit Chrom(VI) ergab sich bei allen Proben aus dem vorderen Abschnitt ein Anteil von *E. coli* zwischen 18,1% und 33%. Die geringsten Anteile an *E. coli* zeigten dabei die Duplikate mit 3 mM Chrom(VI), mit im Detail 26,5% (Replikat I) und 18,1% (Replikat II). Passend dazu lag der Anteil an *Leucobacter* in Proben aus dem vorderen Bereich der Chips zwischen 67 - 81,9%. Abhängig der verwendeten Chromkonzentration ergaben sich für die hinteren Bereiche allerdings deutliche Unterschiede in der Verteilung beider Mikroorganismen. In Chips mit 1 mM Chrom(VI) fand sich ein mittleres *E. coli* / *L. chromiiresistens*-Verhältnis von 87,1% zu 12,9%. Bereits mit 2 mM Chrom(VI) wechselte dies zu einem im Mittel gleichen Verhältnis beider Spezies (53,6% *E. coli* und 46,4% *L. chromiiresistens*). Hier zeigte sich jedoch auch ein deutlicher Unterschied zwischen den Replikaten, mit 75,6% zu 24,4% (Replikat I) und 31,6% zu 68,4% (Replikat II). Proben aus mit 3 mM Chrom(VI) kultivierten Chips zeigten eine konsistentere Verteilung, mit einem merklich größeren Anteil an *L. chromiiresistens*, wie er auch in den Proben aus den vorderen Abschnitten dieser Chips zu finden war. Die gemittelten Daten ergaben dabei einen *E. coli* Anteil von 14,2% und einen resultierenden *L. chromiiresistens* Anteil von 85,8%.

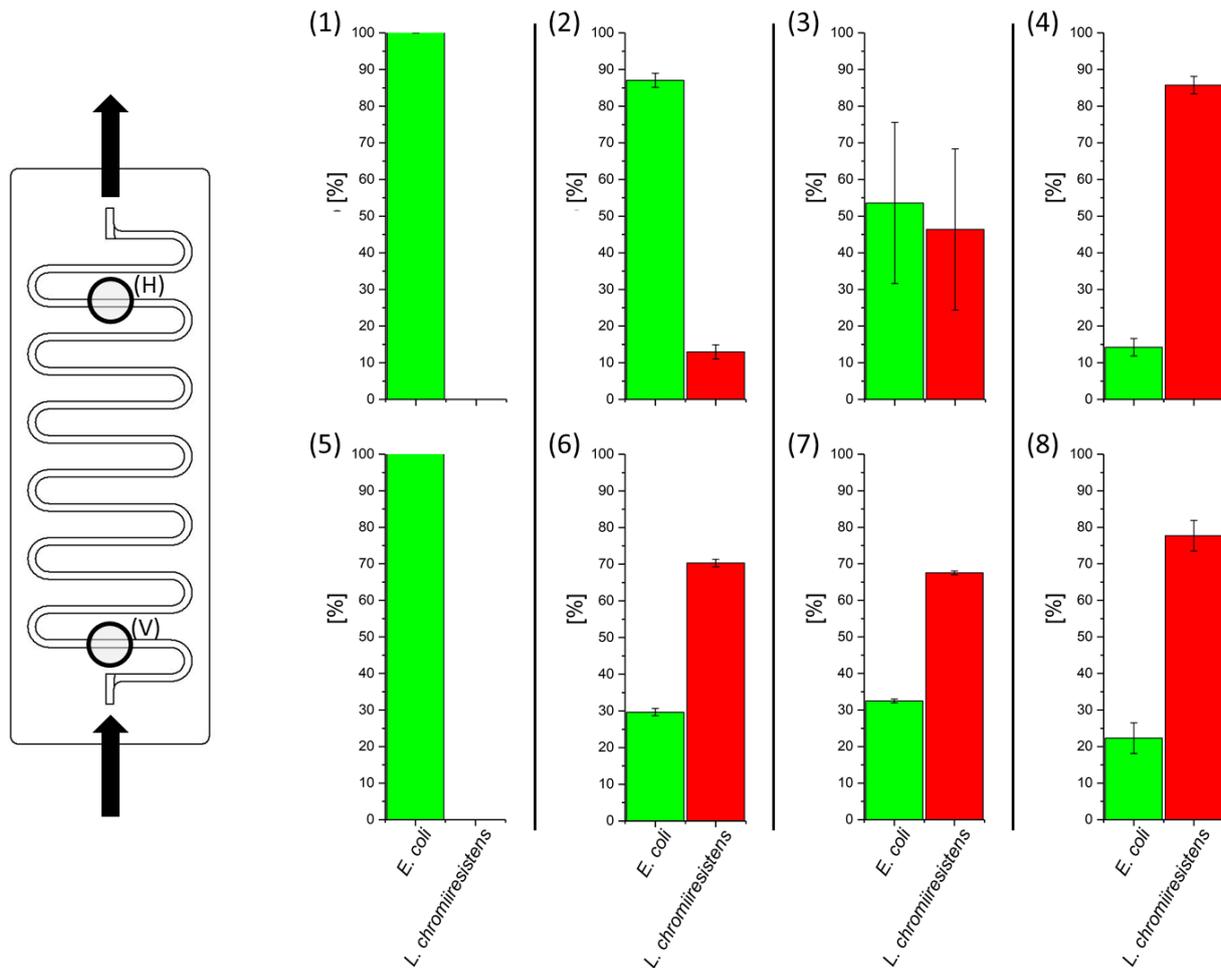


Abb. 27: Darstellung des Spezies-Verhältnisses vorderer (V) und hinterer Bereiche (H) Co-kultivierter Chips unter Einfluss unterschiedlicher Chrom(VI)-Konzentrationen. In grün wird der Anteil von *E. coli*, in rot von *L. chromiirestiens* dargestellt. Die Analyse erfolgte durch die robotergestützte Probenahme kombiniert mit 16S-rDNA Amplicon Sequenzierung. (1) - (4) stammen aus hinteren, (5) - (8) aus vorderen Bereichen des Systems. (1) und (5) stammen aus Kultivierungen ohne Chrom(VI), (2) und (6) wurden mit 1 mM, (3) und (7) mit 2 mM und (4) und (8) mit 3 mM Chrom(VI) kultiviert.

Als ergänzende Aufklärung der Biofilmmzusammensetzung wurden alle Chips nach der Probenentnahme fixiert und per automatisierter FISH analysiert (s. auch 2.2.1).

Abbildung 28 zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen aus Chipwindungen, welche ebenfalls für die robotergestützte Probenahme herangezogen wurden. Die Beobachtungen bestätigten die Ergebnisse aus der Auswertung durch die 16S-rDNA Amplicon Sequenzierung. So wurde für Chipkultivierungen ohne den Einfluss von Chrom(VI) im gesamten Kanal eine deutliche Dominanz von *E. coli* Zellen ausgemacht. Biofilme aus vorderen Bereichen der mit Chrom(VI) kultivierten Chips setzten sich mehrheitlich aus *L. chromiirestiens*-Zellen zusammen, womit sich auch hier die mikroskopischen Beobachtungen mit den Ergebnissen der

Sequenzierung deckten. In den hinteren Kanalabschnitten der Kultivierungen mit 2 mM und 3 mM wurde *L. chromiirestiens* als dominante Spezies des Konsortiums ausgemacht. Hierbei konnten vereinzelte *E. coli* Zellen mit größerer Häufigkeit in mit 2 mM kultivierten Chips gefunden werden. Betrachtete man nun die hinteren Bereiche der mit 1 mM Chrom(VI) belasteten Co-Kultivierung zeigte sich ein für dieses Experiment besonderer Effekt. Verglichen mit der ansonsten flachen Wuchsform von *L. chromiirestiens* bildete sich in diesen Chips ab einem spezifischen Punkt des Kanals ein sehr dichter, mit *Leucobacter* besetzter und auch deutlich dickerer Biofilm aus, welcher aber ebenfalls zu großen Teilen von langgestreckten *E. coli* Zellen durchzogen wurde. In allen mit Chrom(VI) kultivierten Chips wiesen die meisten der observierten *E. coli* Zellen ein auffällig starkes Längenwachstum auf, allerdings konnte in keinem Ansatz ein vergleichbar hoher Anteil wie in den hinteren Abschnitten der 1 mM-Duplikate entdeckt werden.

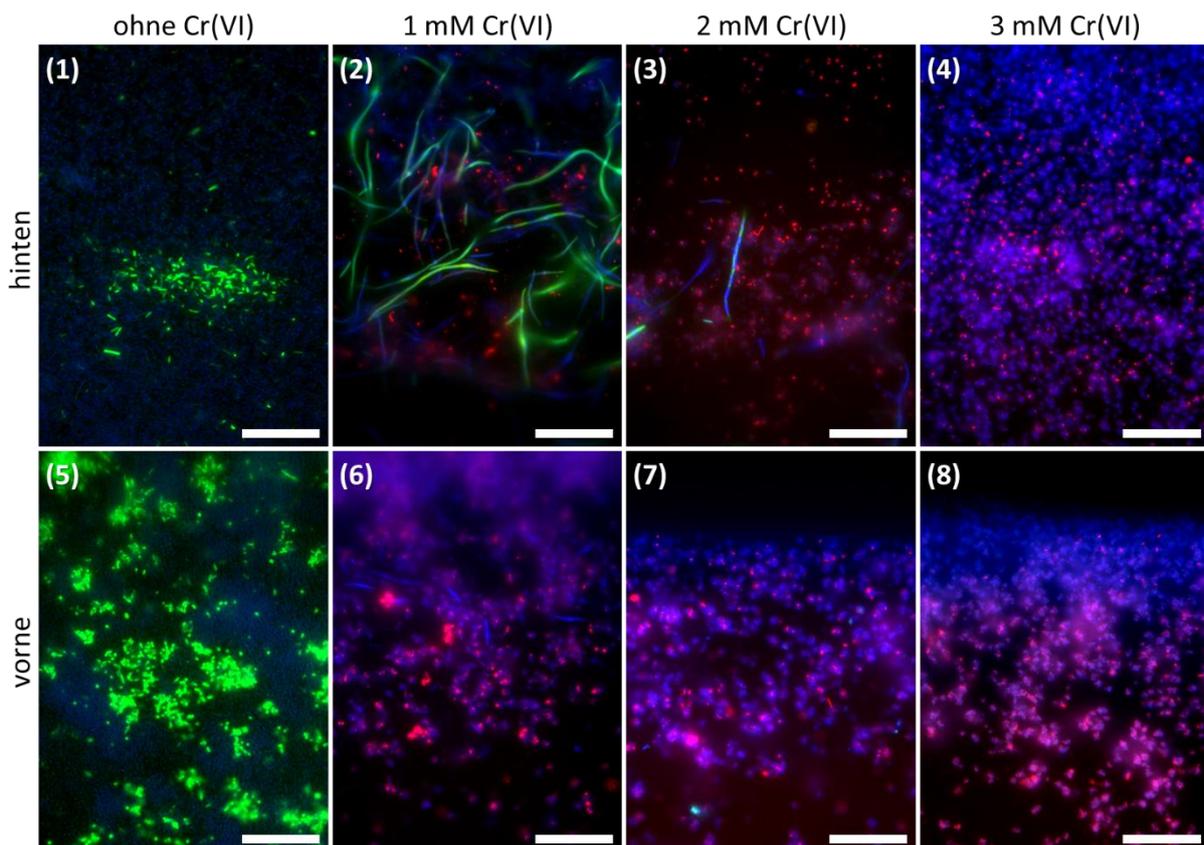


Abb. 28: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen aus Regionen der in Abb. 27 aufgezeigten Probenahme. (1) - (4) stammen aus hinteren, (5) - (8) aus vorderen Bereichen des Systems. (1) und (5) stammen aus Kultivierungen ohne Chrom(VI), (2) und (6) wurden mit 1 mM, (3) und (7) mit 2 mM und (4) und (8) mit 3 mM Chrom(VI) kultiviert. Alle Aufnahmen wurden mit 630facher Vergrößerung aufgenommen, Größenbalken 50  $\mu\text{m}$ . (rot: HGC69a; grün: Ent; blau: DAPI-Gegenfärbung).

Allgemeine Beobachtungen der Co-Kultur-Biofilme zeigten, dass sich neben der bereits beschriebenen meist flachen Wuchsform der *L. chromiiresistens*-Zellen auch größere, Streamer-artige Biofilme ausbildeten (s. auch Abschnitt 6.2). Eine weitere Charakteristik der in diesem Experiment kultivierten Biofilme war, dass zusätzlich zu den mit Sonden markierten Zellen auch viele nur mittels DAPI gefärbte Strukturen gefunden wurden. Diese ließen sich aber anhand der unterschiedlichen Zellmorphologie beider Mikroorganismen unterscheiden. Auffällig war dabei allerdings ein häufiges Vorkommen kokkoider, nur DAPI-gefärbter Strukturen um Sonden-markierte *L. chromiiresistens*-Zellen.

### 3.4 Einfluss von UV-C Strahlung auf die Biofilmbildung

Aufgrund der Strahlungsdurchlässigkeit des PDMS besteht das Potential zur nicht-invasiven Beeinflussung im Chip befindlicher Mikroorganismen durch UV-Strahlung. Dies eröffnet eine Anwendungsmöglichkeit des Chipsystems als Mutagenese-Plattform oder der Untersuchung des Einflusses energiereicher Strahlung auf dynamische Biofilmbildung.

Als erste in dieser Arbeit beschriebenen Anwendung des neuen mikrofluidischen Chipsystems sollte der Einfluss kurzwelliger Ultraviolettstrahlung (UV-C Strahlung bei 254 nm) auf einen anwachsenden *E. coli* Biofilm per Absorptionsmessung und resultierender Zellzahlbestimmung analysiert werden.

Die Biofilme wurden dafür über Nacht mit 10%igem LB, einem Substrat-reduzierten Vollmedium, angezogen. Unterschiede in den einzelnen Ansätzen bestanden in einer initialen Bestrahlung durch UV-C, welche stets einmalig im Anschluss an die Inokulation der Chips erfolgte. Es wurden Replikate zu Ansätzen mit 5 min, 10 min und 20 min Bestrahlungszeit generiert. Bei einer Mindestintensität der UV-Lampe von  $0,069 \text{ mW/cm}^2$  resultierten daraus Bestrahlungen von  $20,7 \text{ mJ/cm}^2$ ,  $41,4 \text{ mJ/cm}^2$  und  $82,8 \text{ mJ/cm}^2$ . Als Kontrolle diente die Kultivierung eines Biofilms ohne den Einfluss zusätzlicher UV-Strahlung.

Nach der Kultivierungsphase wurde mit Hilfe einer speziell entwickelten Cartridge für alle Chips die optische Dichte bei 600 nm gemessen (s. auch Abschnitt 2.2.3). Mit dieser Methode konnte der gesamte mäanderförmige Kanal eines Chips ausgemessen werden. Nach Abzug des Chip-spezifischen Nullwertes konnte aus den Messdaten eine Heatmap generiert und Unterschiede in der Dichte des kultivierten Biofilms graphisch dargestellt werden (s. Abb. 29).

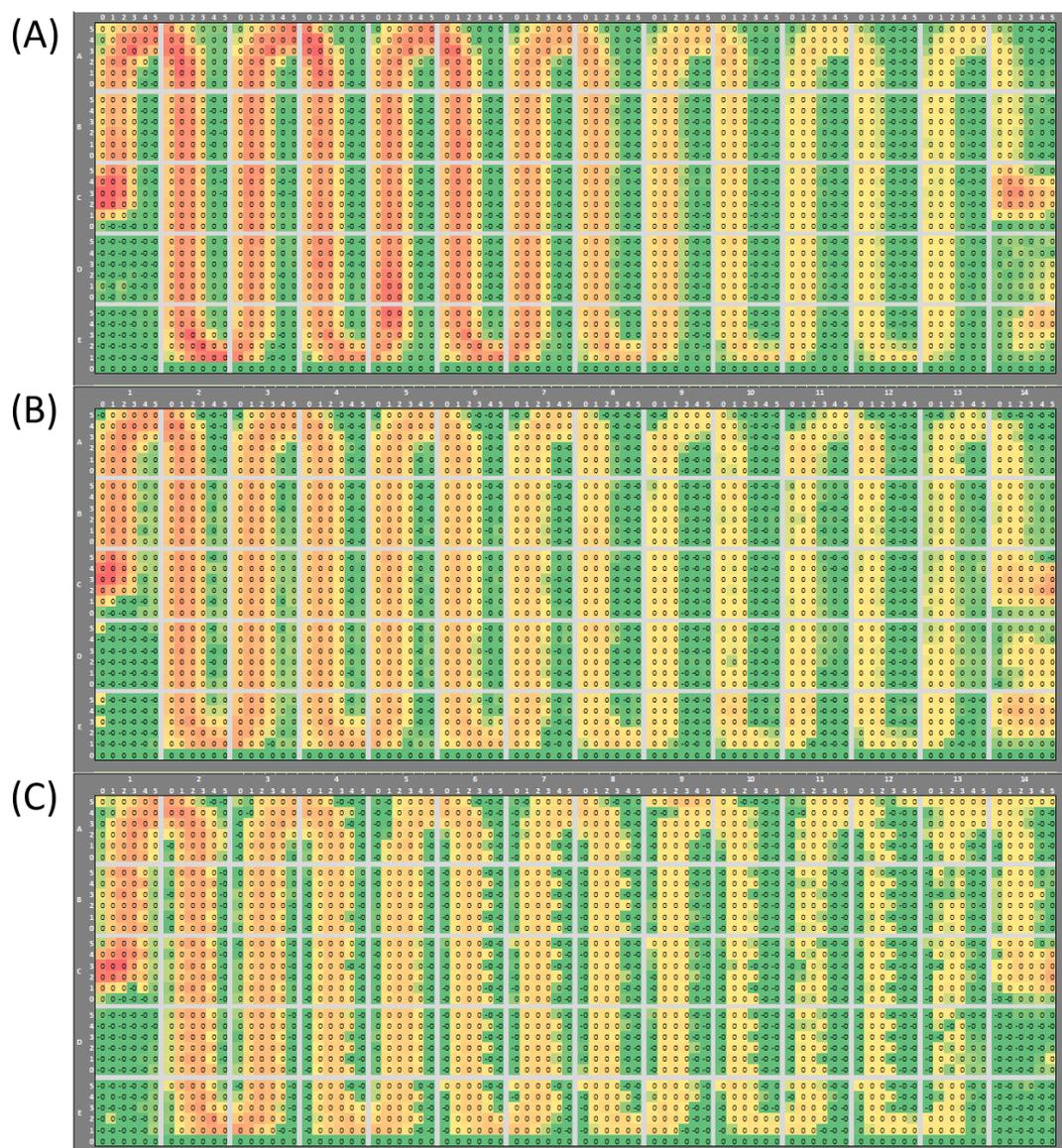


Abb. 29: Darstellung beispielhafter Heatmaps aus der Absorptionsmessung von Chips (A) ohne und mit (B)  $20,7 \text{ mJ/cm}^2$  beziehungsweise (C)  $41,4 \text{ mJ/cm}^2$  Bestrahlung. Die Kultivierung der *E. coli* Biofilme erfolgte mit 10%igem LB. Die Intensität der Färbungen bezieht sich auf die internen Abgleiche der Daten einzelner Chips. Rot = hoher Absorptionswert; grün = niedriger Absorptionswert.

Zusätzlich wurde mithilfe des Spezies-definierten Koeffizienten (s. auch Abschnitt 2.8) aus den gemessenen Absorptionswerten die resultierende Zellzahl bestimmt (s. Abb. 30).

In Einzelbetrachtung der Zellzahlen pro Windung, also der Positionen innerhalb der Chips, ergab sich ein klares Bild für den Einfluss der UV-Strahlung. Je höher die Bestrahlung, umso geringer die Anzahl kultivierter Zellen innerhalb des Biofilms. Zusätzlich konnte mit der Absorptionsmessung, sowohl flächendeckend per Heatmap als auch in Einzelbetrachtung der

Zellzahlen, ein Dichtegradient über den Verlauf der Chips dargestellt werden. Dieser ergab sich für alle Chips des Experiments in unterschiedlicher Höhe der jeweiligen Zelldichte.

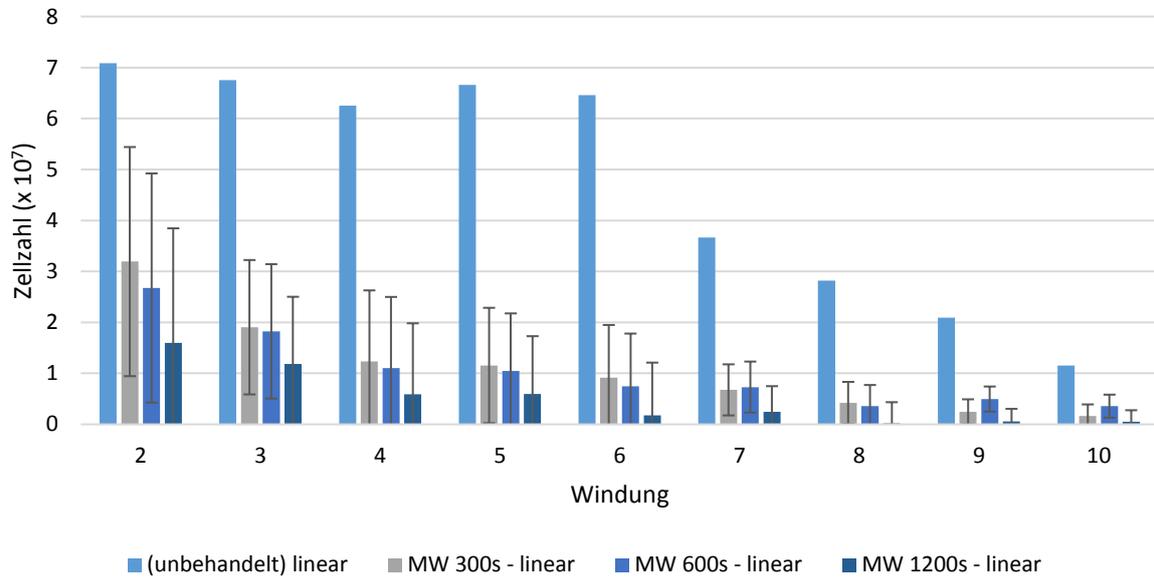


Abb. 30: Graphische Darstellung mittlerer Zellzahlen mehrerer UV-C bestrahlter Chips und nicht bestrahlter Kontrolle. Aufgetragen ist die berechnete Zellzahl abhängig von der Windung des Chips.

### 3.5 Stammentwicklung mit Hilfe des mikrofluidischen Chipsystems

Eine weitere Anwendung des mikrofluidischen Chipsystems stellte dessen Verwendung als Zucht- und Selektionsplattform dar. Als *Proof of Concept* diente die Generierung optimierter Stämme für den Einsatz in mikrobiellen Brennstoffzellen. Als zu optimierender Faktor wurde die Toleranz gegenüber Methylenblau gewählt, einem (besonders für synthetisch-exoelektrogene Stämme essentiellen) Elektronenmediator mit ebenfalls Wachstumsinhibierender Wirkung.

Ausgangsstamm für die Optimierung war JG806 („Starter“), ein nicht zur Gärung befähigter *E. coli* Stamm, welcher zum Zeitpunkt der Arbeit in verschiedenen Varianten bereits in mikrobiellen Brennstoffzellen zum Einsatz kam (Förster *et al.*, 2017).

Die Gradienten-basierte Selektionsplattform, bestehend aus drei in Reihe verlaufender Chips mit multiplen Zugängen (s. auch Abb. 16), wurde in der ersten Chipeinheit mit dem Ausgangsstamm inokuliert und für mehrere Wochen kultiviert (s. auch Abb. 31). Der Hauptstrom des Systems betrug 5  $\mu\text{l}/\text{min}$  und entsprach dem Mediumzufluss des vordersten Chips der Reihe. Das System wurde in jedem folgendem Chip um einen weiteren Zufluss frischen Mediums ergänzt. Für diese Chips ergab sich ein additiver Zugang (1  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) frischen Mediums mit einer erhöhten Methylenblaukonzentration. Dies führte zu einer stufenweisen Erhöhung der Konzentration innerhalb des fluidischen Systems. Das Experiment startete mit 50  $\mu\text{M}$  Methylenblau im Hauptstrom und additiven Konzentrationen von 350  $\mu\text{M}$  für den zweiten und 800  $\mu\text{M}$  für den dritten Chip. Aufgrund der kleineren Zustromvolumina von 1  $\mu\text{l}/\text{min}$  resultierten daraus tatsächliche Konzentrationen von 50  $\mu\text{M}$  in der ersten, 100  $\mu\text{M}$  in der zweiten und 200  $\mu\text{M}$  in der dritten Chipeinheit. Zur Erhöhung des Selektionsdrucks im fortgeschrittenen Experimentverlauf erfolgte eine Steigerung der Methylenblaukonzentrationen additiver Medien auf 1000  $\mu\text{M}$  und 2000  $\mu\text{M}$ .

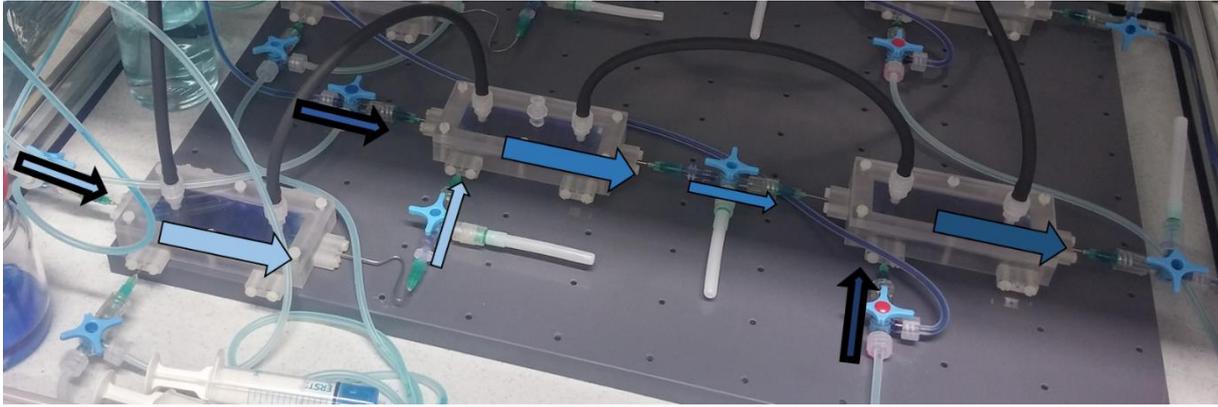


Abb. 31: Darstellung des Aufbaus der Selektionsplattform bestehend aus drei Chips, inklusive skizzierten Fließschema. Die Höhe der Methylenblaukonzentration wird durch die Intensität der Blaufärbung der Fließpfeile markiert. Pfeile mit schwarzer Kontur stellen additive Zuflüsse in das System dar. Über den Verlauf der Fluidik kommt es durch die Chip-weise Neukombination des Hauptstromes und eines weiteren Zuflusses zu einer stufenweisen Erhöhung der Methylenblaukonzentration innerhalb des mikrofluidischen Systems.

Während der Chipkultivierung wurden wöchentlich Proben des Durchflusses genommen und auf Agarplatten mit LB und Methylenblau aufgetragen (s. auch Abb. 32(C)). Frisch auftretende Biofilme wurden bei Bedarf weiter vereinzelt und in einem Vorscreening auf ihre Methylenblautoleranz überprüft. Hierbei wurden willkürlich gewählte Kolonien in frischem LB vorkultiviert und für die Inokulation in Minimalmedium mit ansteigender Methylenblaukonzentration verwendet. Kultiviert wurde im 96-Wellmaßstab direkt innerhalb des Plattenlesegerätes was eine Inkubation bei 37 °C und die kontinuierliche Messung der optischen Dichte ermöglichte. Methylenblau weist in seiner oxidierten Form ein Absorptionsmaximum nahe der regulär für die Zelldichtebestimmung genutzten 600 nm auf, weshalb die optische Dichte bei 850 nm gemessen wurde. Aus den Daten der Absorptionsmessung wurden die maximale Wachstumsrate und optische Dichte der einzelnen Ansätze bestimmt (s. Tab. 34).

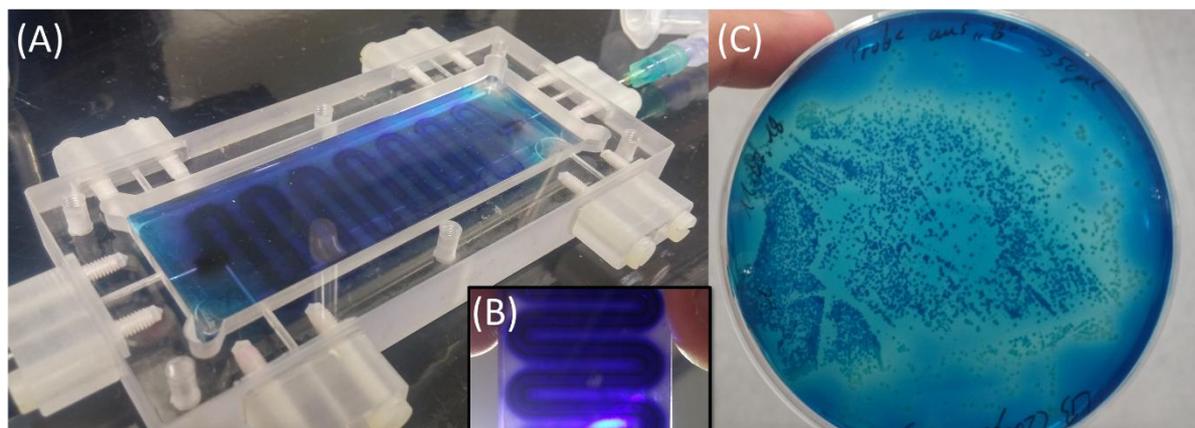


Abb. 32: (A) Einzelner Chip des Zuchtsetups zur Optimierung der Methylenblautoleranz von JG806 und (C) beispielhafte LB/Methylenblau-Platte zur Anzucht entnommener Proben. Methylenblau ist in seiner reduzierten Form farblos, weshalb stets eine Entfärbung von Bereichen mit aktiven, Methylenblau-reduzierenden Zellen beobachtet wurde. (B) zeigt eine durchleuchtete Darstellung des hinteren Bereichs eines kultivierten Chips. In diesen Kanalabschnitten konnten Biofilme meist nur am Rand der fluidischen Struktur ausgemacht werden.

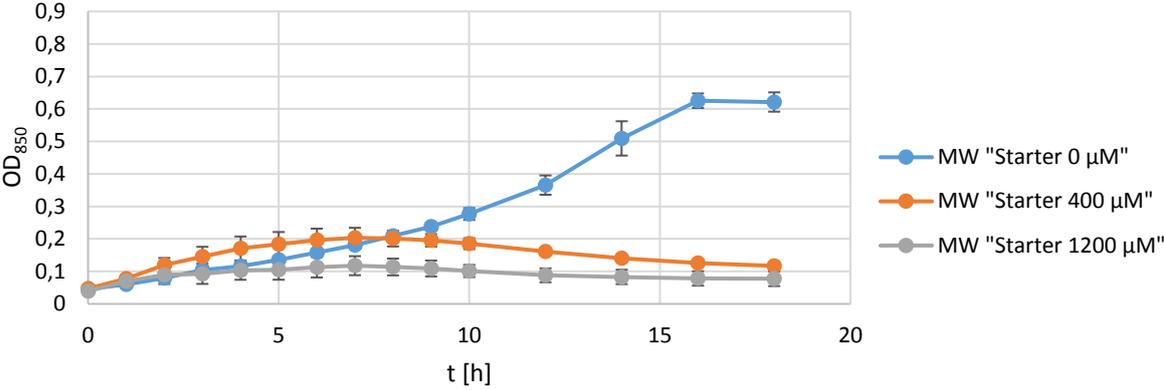
Tab. 34: Auflistung maximaler optischer Dichten und Steigungen aus Vorversuchen zur Methylenblautoleranz. Getestet wurden der Ausgangsstamm und neue Stammvarianten aus dem Chipsystem. Für den Ausgangsstamm wurden vier, für jede Stammvariante zwei Replikate angesetzt. Die Messung der optischen Dichte erfolgte bei 850 nm, die Wachstumsrate bezieht sich auf die Veränderung der optischen Dichte innerhalb einer Stunde. Der Farbverlauf von grün (maximaler Wert) nach rot (minimaler Wert) markiert Unterschiede der ermittelten Daten.

Methylenblau [ $\mu\text{M}$ ]:		max. optische Dichte bei 850 nm					max. Wachstumsrate [1/h]				
		0	200	400	800	1200	0	200	400	800	1200
Stammvariante	Replikat										
Ausgangsstamm	A2	0,101	0,030	0,029	0,026	0,031	0,040	0,018	0,009	0,014	0,020
	B2	0,096	0,030	0,032	0,028	0,031	0,024	0,013	0,009	0,013	0,018
	C2	0,095	0,035	0,035	0,029	0,033	0,037	0,020	0,013	0,010	0,020
	D2	0,100	0,037	0,036	0,030	0,030	0,021	0,027	0,011	0,016	0,015
"1"	E2	-	0,158	0,133	0,110	0,084	-	0,040	0,047	0,048	0,030
	F2	0,133	0,122	0,154	0,106	0,088	0,042	0,035	0,045	0,044	0,034
"2"	G2	0,128	0,124	0,169	0,101	0,092	0,028	0,039	0,036	0,026	0,034
	H2	0,117	0,141	0,118	0,097	0,082	0,027	0,036	0,034	0,032	0,024
"3"	A8	0,186	0,053	0,032	0,030	0,033	0,026	0,025	0,007	0,010	0,019
	B8	0,179	0,065	0,036	0,032	0,035	0,028	0,024	0,009	0,012	0,020
"4"	C8	0,180	0,105	0,093	0,071	0,065	0,033	0,030	0,021	0,022	0,025
	D8	0,197	0,105	0,097	0,084	0,065	0,025	0,033	0,020	0,045	0,016
"5"	E8	0,178	0,090	0,089	0,078	0,062	0,026	0,026	0,020	0,017	0,014
	F8	0,176	0,097	0,090	0,076	0,057	0,024	0,024	0,022	0,016	0,019
"6"	G8	0,170	0,085	0,017	0,016	0,016	0,027	0,024	0,006	0,010	0,013
	H8	0,173	0,081	0,017	0,014	0,014	0,034	0,018	0,004	0,008	0,011

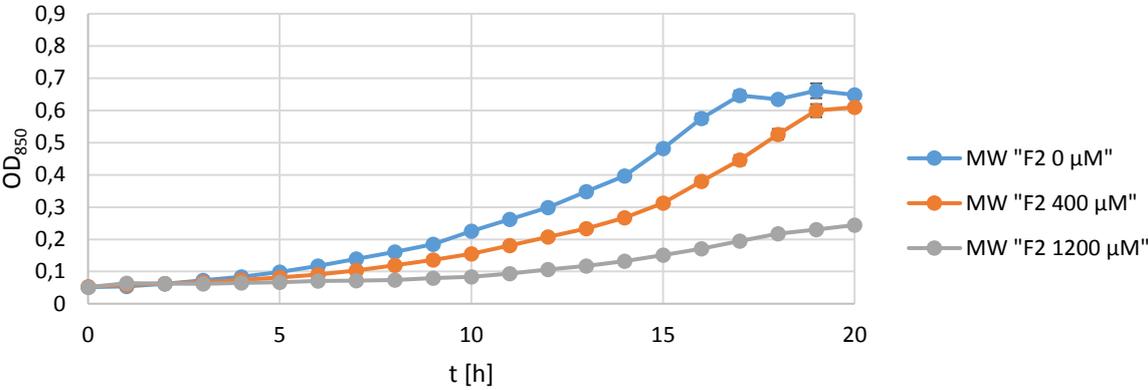
Basierend auf diesen Vortests wurden zwei neue Stammvarianten, im nachfolgenden „F2“ und „C8“ genannt, ausgewählt und weiter charakterisiert. In einem ersten Schritt wurden detailliertere Wachstumsversuche im Erlenmeyerkolben-Maßstab durchgeführt. Dafür wurden Minimalmedien ohne, mit 400  $\mu\text{M}$  und 1200  $\mu\text{M}$  Methylenblau verwendet. Die jeweiligen Wachstumsraten berechneten sich anhand der stündlichen Zunahme der optischen Dichte bei 850 nm. Als Referenz erfolgten alle Experimente stets auch mit dem Ausgangsstamm, angezogen aus dem bei - 80 °C gesicherten Chip-Inokulum. Es zeigte sich, dass dieser nicht mit den gewählten Methylenblau-Konzentrationen wachsen konnte (s. Abb. 33(A)). Als maximale Wachstumsrate in Medium ohne Methylenblau wurde ein mittlerer Wert von 0,072 (Steigung zu  $t = 14$  h) berechnet. Der Stamm JG806-F2 zeigte für Kultivierungen in nicht-komplementiertem Minimalmedium eine maximale Rate von 0,093 ( $t = 16$  h), mit einer Reduzierung auf maximal 0,080 ( $t = 18$  h) mit 400  $\mu\text{M}$  Methylenblau und zeigte auch Wachstum in Anwesenheit von 1200  $\mu\text{M}$  (maximale detektierte Wachstumsrate: 0,025 bei  $t = 17$  h) (s. Abb. 33(B)). Die Stammvariante C8 konnte ebenfalls mit beiden Methylenblaukonzentrationen noch ein stetiges Wachstum aufweisen. Auffällig war hier ein erhöhter Endwert der erreichten optischen Dichte im Vergleich sowohl zum Ausgangsstamm, als auch zur F2-Variante (s. Abb. 33(C)). Die maximale Wachstumsrate für Kultivierungen ohne Methylenblau betrug 0,096 (identisch für  $t = 14$  h und 17 h). Für Ansätze mit Methylenblau ergab sich im observierten Zeitraum mit 400  $\mu\text{M}$  ein maximaler Wert von 0,044 ( $t = 18$  h) und 0,021 ( $t = 16$  h) mit 1200  $\mu\text{M}$ . Beide neuen Stämme konnten in Anwesenheit von Methylenblau eine vergleichbar hohe Dichte wie in Ansätzen ohne den Elektronenmediator erreichen.

Unterstützend zu der Dokumentation der Absorptionsänderung erfolgten phasenkontrastmikroskopische Beobachtungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Wachstumsverlaufs (s. Abb. 34). Dabei zeigten Zellen des Ausgangsstammes in Anwesenheit von Methylenblau bereits nach kurzer Zeit eine deutliche Farbveränderung. Dies wurde auch bei Zellen beider neuer Stammvarianten beobachtet, kam dort aber in geringerem Ausmaß vor. Morphologisch ergab sich für die Mehrheit der Zellen beider neuen Stammvarianten innerhalb des Wachstumsverlaufs mit Methylenblau kein mikroskopisch erkennbarer Unterschied zu Kultivierungen mit nicht komplementiertem Minimalmedium.

(A) JG806 - Ausgangsstamm



(B) JG806 - F2



(C) JG806 - C8

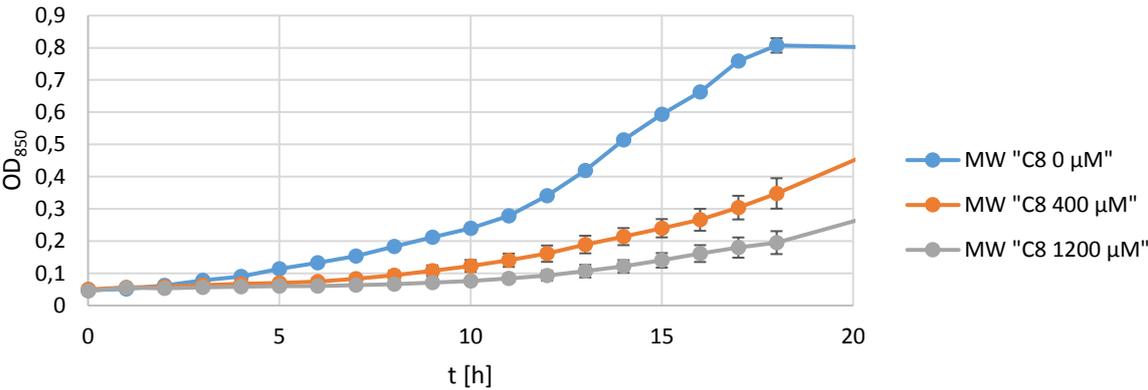


Abb. 33: Wachstumsverhalten des (A) Ausgangsstammes JG806 sowie der neuen Stammvarianten (B) F2 und (C) C8 mit und ohne Methylenblau. Aufgetragen wurde die ermittelte optische Dichte bei 850 nm gegen die Zeit. Der Ausgangsstamm wies mit 400 μM als auch mit 1200 μM Methylenblau nach einer kurzen Phase der Absorptionzunahme kein weiteres Wachstum auf. Für die neuen Stammvarianten F2 und C8 wurde in allen Ansätzen Wachstum beobachtet. Mit Zunahme der Methylenblaukonzentration verringerte sich die Wachstumsrate.

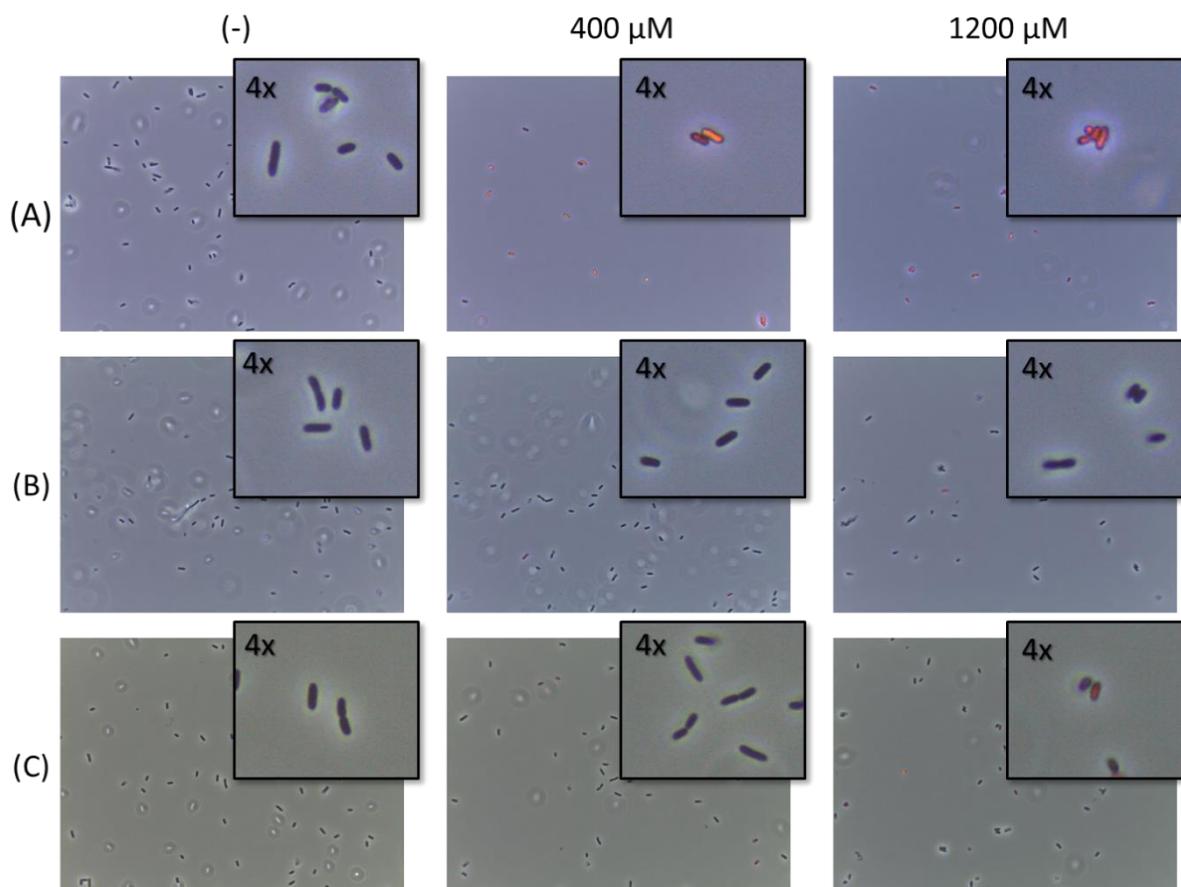


Abb. 34: Exemplarische Aufnahmen aus den ersten 10 h der Wachstumsexperimente ohne und mit 400  $\mu\text{M}$  bzw. 1200  $\mu\text{M}$  Methylenblau. Kultivierungen des Ausgangsstammes mit Methylenblau führten zu im Phasenkontrast rotgefärbten Zellen. (A) = Ausgangsstamm; (B) = Stammvariante F2; (C) = Stammvariante C8. Alle Aufnahmen erfolgten mit 1000facher Vergrößerung. Eingerahmte Ausschnitte zeigen eine technisch 4fach vergrößerte Darstellung eines Teilbereichs der entsprechenden Abbildung.

Zur bioelektrochemischen Anwendung musste die Atmungskette aller drei Stämme um den Elektronenübertrag in den periplasmatischen Raum verlängert werden. Dafür wurde das jeweilige Proteinset um das periplasmatische STC (*small tetraheme cytochrome*) und die Maturations-Proteine für die Hämbildung ergänzt. Die Komplementierung erfolgte durch die Plasmide pBAD-STC und pEC86. Diese waren bereits Teil der Stammsammlung der AG Gescher und wurden per Elektroporation in alle Stammvarianten eingebracht. Zur Kontrolle der Transformation wurden die Primerpaarungen #1194/1195 und #788/789 verwendet (s. auch Abschnitt 6.2).

Um sicherzustellen, dass die neuerworbenen Toleranzen nicht durch eine verringerte Aufnahme des Methylenblaus und einer damit reduzierten Reduktionsrate einhergingen, wurde eine Überprüfung der Reduktionskinetik der neuen Stämme in Relation zum Ausgangsstamm durchgeführt.

Für den Assay eingesetzte Zellen wurden über Nacht in LB vorkultiviert (37 °C), in frischem Vollmedium aufgenommen, die komplementierten Plasmide mittels Anhydrotetracyclin (AHT) und Arabinose induziert (s. auch Abschnitt 2.9) und für zusätzliche 4 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Ansätze in definiertem Inkubationsmedium mit DMSO, Glucose und beiden Induktoren gewaschen, in selbigem aufgenommen und für weitere 18 h in anoxischer Umgebung inkubiert. Alle Kultivierungs- und Inkubationsschritte erfolgten unter Zugabe der Antibiotika Chloramphenicol und Kanamycin zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks der neu eingebrachten Plasmide. Final wurden die Zellen in Minimalmedium ohne Glucose und DMSO gewaschen und in den Reduktionsassay eingesetzt. Der Test fand unter anoxischen Bedingungen (Anaerobenzelt) im 96-Wellmaßstab statt. Vorgelegt waren isotonische Lösungen mit ansteigenden Konzentrationen an Methylenblau. Mit Zugabe der Zellen startete der Assay. Die Auslesung erfolgte für 15 min durch die permanente Messung der Absorption bei 660 nm (s. auch Abschnitt 2.9). Die dokumentierten Reduktionsgeschwindigkeiten bei unterschiedlichen Startkonzentrationen an Methylenblau wurde dazu verwendet die Konzentrations-spezifischen Reduktionsraten aller drei Stämme zu bestimmen (s. Abb. 35). Nach der Normalisierung der Reduktionsraten auf die eingesetzten Zelldichten konnte im Rahmen dieses Assays kein signifikanter Unterschied in der Reduktionskapazität der Stammvarianten festgestellt werden.

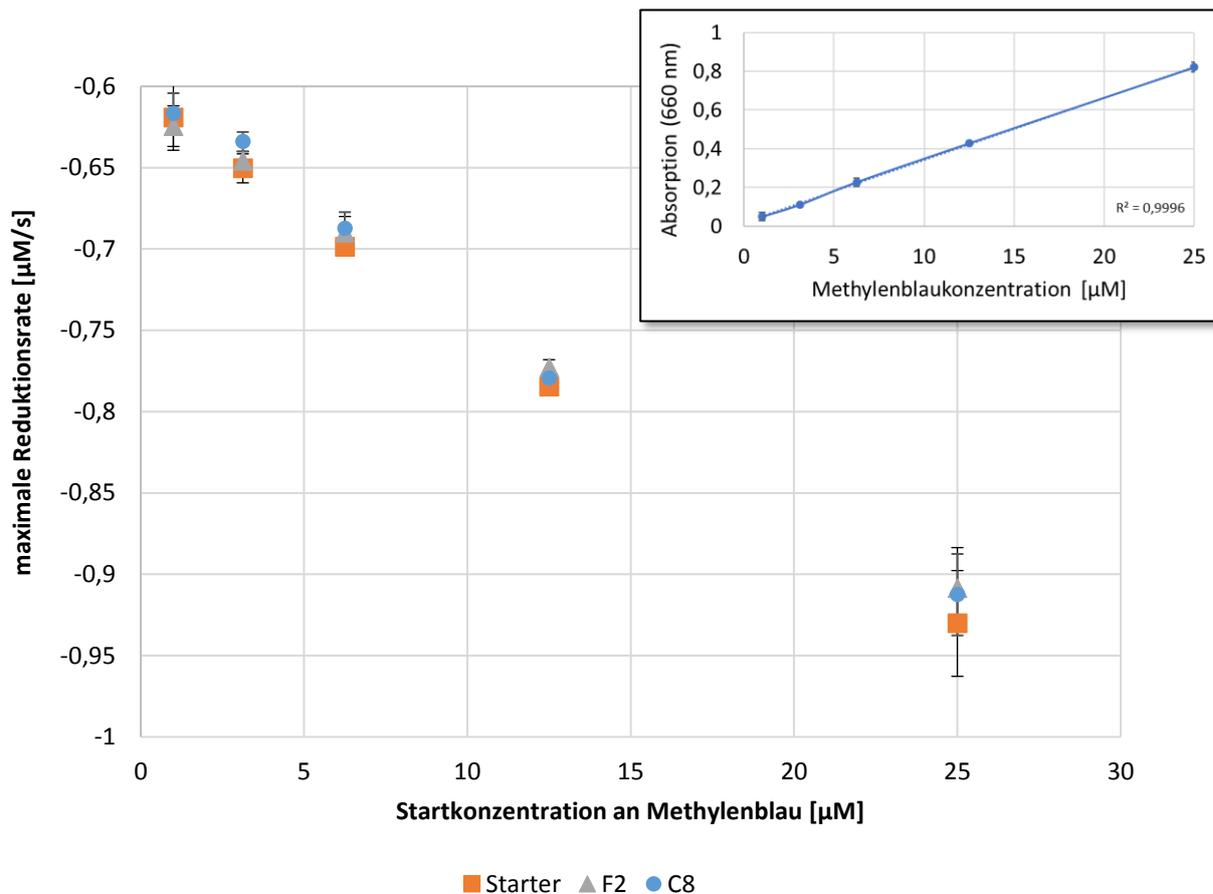


Abb. 35: Ergebnis des Assays zur Reduktionskinetik von Methyleneblau aller drei Stammvarianten. Gezeigt werden die maximalen Reduktionsraten in Abhängigkeit der Startkonzentration von Methyleneblau. Die integrierte Abbildung zeigt das Verhältnis der Absorption zur Methyleneblaukonzentration im verwendeten Plattenassay.

Um mehr über den Hintergrund der neuerworbenen Methyleneblautoleranz zu erfahren, wurde aus allen drei Stammvarianten die genomische DNA extrahiert und vollständig sequenziert. Mit den resultierenden Reads der Genomsequenzierung wurde eine Variantenanalyse gegen das assemblierte Genom des Ausgangsstamm durchgeführt. Die Assemblierung des Referenzgenoms fand durch den Abgleich mit einer bestehenden Sequenzierung des Stammes JG806 statt. Die Annotation wurde übernommen und basierte auf *Prodigal 2.6*. Eine Zusammenfassung der Analyse findet sich in Tabelle 35.

Es zeigten sich insgesamt fünf Unterschiede zwischen dem Ausgangsstamm und dem Stamm F2 und drei für C8 (s. Tab. 35). Gemeinsame Variationen zum Ausgangsstamm war eine Insertion innerhalb eines hypothetischen Proteins und eine *single nucleotide variation* (SNV) in relativer Nähe ( $< 500$  bp) des Gens *ghrA*, welches für die Glyoxylat/Hydroxypyruvat-Reduktase A codiert. Der Stamm F2 zeigte zusätzliche Mutationen in den Genen *aceF* und

*acrR*, welche in dieser Reihenfolge für die Untereinheit E2 (= Dihydrolipoyl-Transacetylase) der Pyruvat-Dehydrogenase und den Regulator AcrR codieren. Weitere Variationen betrafen laut Annotation nicht-codierende Bereiche des Genoms (*intergenic spacer*, IGS). Für C8 ergab sich eine Mutation in der Nähe der Gene *xerD* und *fimA*, welche jeweils für die ortsspezifische Rekombinase XerD und die Untereinheit von Typ-I-Pili codieren.

Tab. 35: Ergebnis der Variantenanalyse beider Stämme. SNV = single nucleotide variation; IGS = intergenic spacer; "hypo. prot" = hypothetisches Protein; "\*" = 500 bp up- bzw. downstream (nur bei fehlendem Treffer in codierenden Bereichen angegeben).

**(F2)**

Region	Mutation	<u>Sequenzvariation</u>		<u>beteiligte Gene</u>		Probabilität
		Referenz	neues Allel	direkt	benachbart*	
3483159-3483160	Insertion	-	C	hypo. prot.	-	1,00
3594151	SNV	G	T	<i>aceF</i>	-	1,00
3856731-3856738	Deletion	TCTCTGTC	-	<i>acrR</i>	-	1,00
4467195	SNV	A	G	(IGS)	<i>ghrA</i>	1,00
4467207	SNV	G	C	(IGS)	<i>ghrA</i>	0,97

**(C8)**

Region	Mutation	<u>Sequenzvariation</u>		<u>beteiligte Gene</u>		Probabilität
		Referenz	neues Allel	direkt	benachbart*	
3367668	SNV	A	T	(IGS)	<i>xerD / fimA</i>	1,00
3483159-3483160	Insertion	-	C	hypo. prot.	-	1,00
4467195	SNV	A	G	(IGS)	<i>ghrA</i>	1,00

Als finaler Test der Stammcharakterisierung wurde die Leistungsfähigkeit der neuen Stammvariante F2 in einer mikrobiellen Brennstoffzelle getestet. Dies wurde im Rahmen der Stromproduktion überprüft (s. Abb. 36 u. Tab. 36). Die Anzucht der Vorkultur erfolgte vergleichbar zu der Vorkultivierung des zuvor beschriebenen Reduktionsassays. In Vollmedium wurden die Zellen über Nacht angezogen, in frischem LB inklusive Induktoren für weitere 4 h kultiviert und final in MFC-Medium mit 20 mM Glucose und 550 µM Methylenblau aufgenommen. Als Referenz dienten Brennstoffzellen mit dem Ausgangsstamm, welche unter

den gleichen Bedingungen betrieben wurden. Um den Einfluss der Limitierung durch die Elektrodenaktivität überprüfen zu können, wurde das elektrische Potential stufenweise gesteigert, was eine Beschleunigung der Rückoxidation des Methylenblaus und damit auch die Wiederaufladung des Elektronenmediators für *E. coli* zur Folge haben sollte. Details des Aufbaus und der Experimentparameter finden sich in Abschnitt 2.10.

Die Steigerungen des Potentials erfolgten zu den Zeitpunkten 2,88 h (von +200 mV auf +400 mV; Angaben gegen das Standardpotential einer Normal-Wasserstoffelektrode - NHE) und 5,11 h (von +400 mV auf +600 mV gegen NHE) nach Start des Experiments.

In den ersten beiden Phasen des Experiments ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Stromproduktion der Stämme. Die mittleren Werte lagen bei  $44,3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  (Phase 1) und  $39,9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  (Phase 2) für die Stammvariante „F2“ und  $40,3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  sowie  $43,7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  für den Ausgangsstamm. Die dritte Phase mit einem angelegten Potential von +600 mV gegen NHE wies in den ersten 1,5 h ebenfalls keine Änderung des Stroms auf. Zwischen den Zeitpunkten 6,4 h - 6,8 h konnte jedoch bei allen Replikaten des neuen Stammes ein Anstieg der Stromproduktion dokumentiert werden. Der Anstieg erfolgte mit vergleichbarer Rate und endete bei allen Stämmen nach weniger als 2 h. Der Anstieg der Stromproduktion unterschied sich signifikant und war, abgesehen einer kurzen Unterbrechung der Konnektivität eines der Replikate (8,3 h - 8,8 h nach Start des Experiments), über den dokumentierten Zeitraum stabil. Die mittlere Stromdichte in dieser Phase des Experiments lag nun bei  $98,4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  für die Stammvariante „F2“ und bei  $38,6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  für die Kontrolle mit dem Ursprungsstamm.

Tab. 36: Tabellarische Darstellung des produzierten Stroms zu verschiedenen Phasen des Experiments. (1) +200 mV; (2) +400 mV; (3) +600 mV; (4) +600 mV - Phase vor dem Anstieg der Stromproduktion; (5) +600 mV - Phase nach dem Anstieg der Stromproduktion. „ $\pm$ “ = Angabe der Standardabweichung.

Phase	mittlere Stromdichte [ $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ]	
	"F2"	"Starter"
0 - 2,88 h <sup>(1)</sup>	44,3 ( $\pm$ 6,1)	40,3 ( $\pm$ 6,8)
2,88 - 5,11 h <sup>(2)</sup>	39,9 ( $\pm$ 2,7)	43,7 ( $\pm$ 4,5)
5,11 - 12 h <sup>(3)</sup>	75,2 ( $\pm$ 31,8)	41,3 ( $\pm$ 3,7)
5,11 - 6 h <sup>(4)</sup>	40,7 ( $\pm$ 1,6)	39,9 ( $\pm$ 2,1)
ab 8 h <sup>(5)</sup>	98,4 ( $\pm$ 27,5)	38,6 ( $\pm$ 3,2)

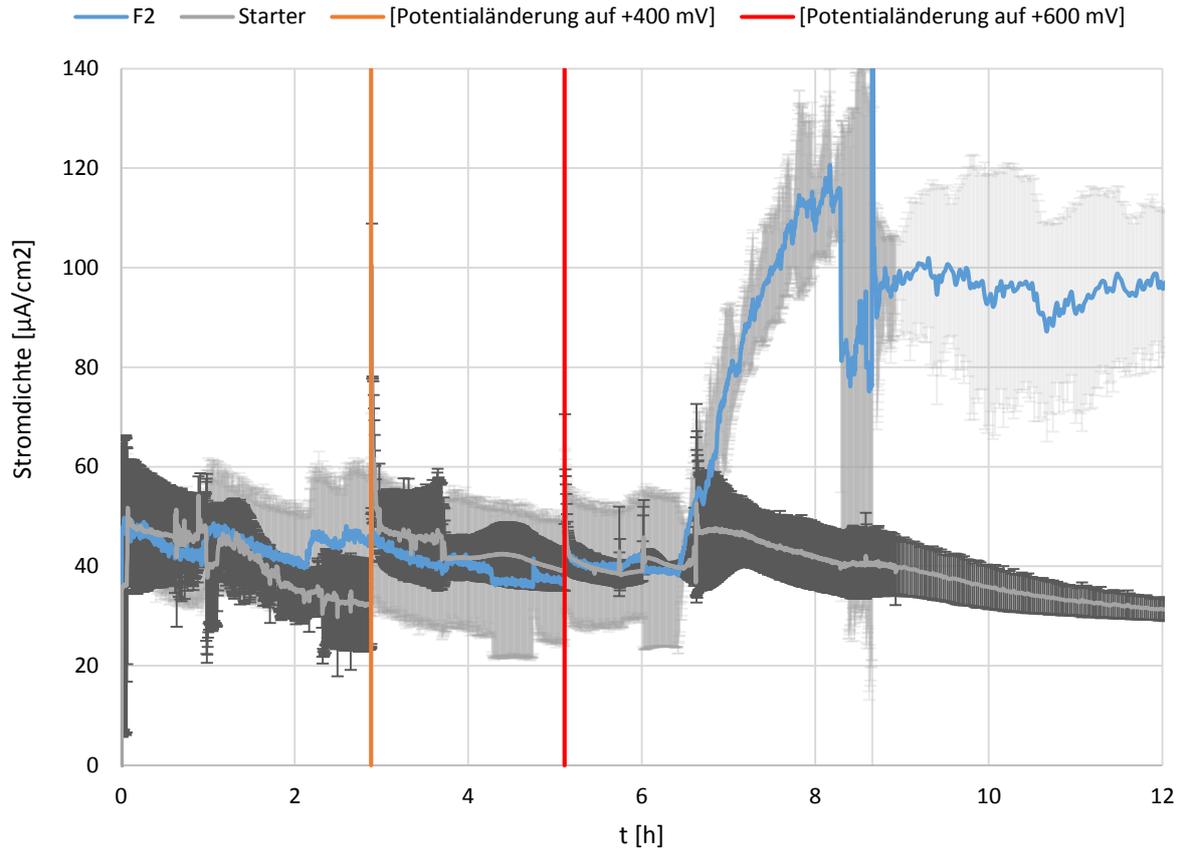


Abb. 36: Verlauf der Stromproduktion des Ausgangsstammes JG806 (grau) und der Stammvariante F2 (blau) in einer mikrobiellen Brennstoffzelle. Potentialsteigerungen erfolgten nach 2,88 h (orange) und 5,11 h (rot). Beide Stammvarianten wiesen bis 6,4 h nach Beginn des Experiments eine ähnlich hohe Stromproduktion auf. Ab diesem Zeitpunkt zeigen Ansätze mit JG806“F2“ eine gesteigerte Stromproduktion, welche bis zum Ende der dokumentierten Phase stabil bleibt. Potentialangaben erfolgen gegen das Standardpotential einer Normal-Wasserstoffelektrode.

## 4. Diskussion

In eine selbstproduzierte Matrix eingebettete mikrobielle Konsortien, sogenannte Biofilme, stellen komplexe Gemeinschaften mit einer vielschichtigen sozialen Struktur und Architektur dar. Oft kommt es innerhalb von Biofilmen zur Ausbildung einer hohen Diversität unterschiedlicher Nischen und der räumlichen Anordnungen ebenso taxonomisch wie physiologisch diverser Mikroorganismen (Nadell *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017). Auch weisen diese sessilen Gemeinschaften im direkten Vergleich zu planktonischen Kulturen eine Reihe erweiterter Eigenschaften, wie z.B. der erhöhten Toleranz gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen, auf (Flemming *et al.*, 2016). Bedingt durch die große Komplexität dieser mikrobiellen Gemeinschaften ist eine stetige Entwicklung und Optimierung neuer Kultivierungs- und Analyseplattformen notwendig. Zwar existieren bereits Strategien zur Biofilmkultivierung, allerdings sind diese vielmals auf eine spezifische Fragestellung reduziert oder ermöglichen nur sehr definierte Analysen der so kultivierten Mikroorganismen (Azeredo *et al.*, 2017).

Aufgrund der vielseitigen Fragestellungen an Biofilmgemeinschaften ist es essentiell ein universell einsetzbares System zu entwickeln. Dafür ist es wichtig den Pool möglicher Methoden sowohl im Bereich der gerichteten Kultivierung als auch der multifaktoriellen Analyse beständig zu erweitern. Mit der Kombination aus einem modular-aufbaubaren System und einem umfangreichen Set kompatibler Analysen könnte so mithilfe einzelner Bausteine eine Vielzahl möglicher Fragestellungen abgedeckt werden.

In dieser Arbeit wurde dies erstmals mit der Etablierung eines neuen mikrofluidischen Chipsystems zur gerichteten, Gradienten-getriebenen Kultivierung und einer Infrastruktur angepasster und robotergestützter Analysen ermöglicht. Im Folgenden werden Aspekte der Handhabung, der allgemeinen und gerichteten Biofilmbildung, der Validierung angepasster Analysemethoden sowie des biotechnologisch nutzbaren Potentials der neuen Plattform diskutiert.

#### 4.1 Charakterisierte Biofilmbildung innerhalb des fluidischen Systems

Zu Beginn dieser Arbeit existierten wenige allgemeingültige Protokolle zur Handhabung des neuentwickelten fluidischen Chipsystems. Dieser Mangel umfasste vor allem die Inokulations- und Vorbereitungsphase, welche einen nachgewiesenen Einfluss auf die Reproduzierbarkeit und Aussagekraft produzierter Replikat haben (Bos *et al.*, 1999). Ein bekannter Fehlerfaktor mikrofluidischer Kultivierungen, mit großem Einfluss auf die Biofilmbildung, stellt dabei die Bildung und Einbringung von Gasblasen dar (Sharma *et al.*, 2005; Asayesh *et al.*, 2017). Neben dem destruktiven Einfluss durch erhöhte Scherkräfte an Phasenübergängen, werden durch Gasblasen abgedeckte Oberflächen unzugänglich für die initiale Besiedelung durch Bakterien oder Archaea. Beides resultiert in einer nicht reproduzierbaren und ungleichmäßigen Verteilung von Zellen. Bedenkt man dabei den Einfluss zell-dichteabhängiger Kommunikation (Quorum sensing) auf frühe Entwicklungsstadien der Biofilmentwicklung (Hammer and Bassler, 2003), wird der enorme Einfluss initialer und räumlich unterschiedlicher Zellkonzentrationen auf die experimentelle Reproduzierbarkeit deutlich.

Um das Risiko einer Kontamination durch Gasblasen zu reduzieren, wurde mithilfe regelbarer Zugänge ein standardisiertes Protokoll zur gasblasenfreien Inokulation und Handhabung des Systems entwickelt. Durch die Eindämmung in das System eingebrachter Blasen unmittelbar vor und während der Inokulation, sowie während laufender Kultivierungsexperimente, verringerte sich zusätzlich auch die Entstehung neuer Gasblasen innerhalb des Systems. Standardisierte Protokolle erlaubten zudem die Kontrolle einer quantifizierbaren Zellzugabe, was einen weiteren positiven Einfluss auf die Reproduzierbarkeit des Systems ausübte. Erweiternd wurde durch eine erhöhte Positionierung der Sammelgefäße gewährleistet, dass der Systemdruck innerhalb des mikrofluidischen Kanals stets leicht höher war als in den mit Druckausgleich versehenen Sammelgefäßen.

Im Rahmen der Systemcharakterisierung sollte auch ein detaillierter Blick auf die Form der Biofilmbildung innerhalb eines mikrofluidischen Chips geworfen werden. Dies umfasste die Frage wie eine Verteilung der Organismen und die daraus resultierende architektonische Ausbildung anwachsender Gemeinschaften innerhalb des fluidischen Systems zu erwarten ist.

Experimentell wurde die Überprüfung neuentwickelter Protokolle sowie die Charakterisierung des Kultivierungssystems in einem kombinierten Ansatz adressiert (s. auch Abschnitt 3.1). Durch die Mono-Kultivierung von *M. luteus* wurde dabei die Art der Biofilmbildung innerhalb des fluidischen Systems bei Anwendung des neukonzipierten Inokulationsprotokolls untersucht. Das generelle Ausbleiben einer Biofilmbildung wurde nicht in Frage gestellt, da das

zur Chipherstellung verwendete PDMS als nicht toxisch beschrieben ist (McDonald and Whitesides, 2002) und bereits in Experimenten zur Biofilmkultivierungen verwendet wurde (Kim *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2014). Dies konnte auch bereits in vorangegangenen Arbeiten mit dem neuen System, anhand unterschiedlicher Spezies gezeigt werden (Kabbeck, 2015; Hansen *et al.*, 2017). Die in dieser Arbeit durchgeführten Kultivierungen mit *M. luteus* zeigten eine allgemeine Tendenz zur Ausbildung unterschiedlich dicht bewachsener Regionen innerhalb des mikrofluidischen Kanals. Dies spiegelte sich deutlich in Form zweier ungleich gerichteter Dichtegradienten.

Es konnte beobachtet werden, dass Biofilme in vorderen Bereichen des mikrofluidischen Chips deutlich dichtere Strukturen aufwiesen, mit abnehmender Tendenz über den restlichen Verlauf des Kanals (s. auch Abb. 21). Zeitlich aufgelöste Untersuchungen legten nahe, dass die Ausbildung eines solchen Dichtegradienten nicht bereits mit Beginn der Kultivierung startete. Dies zeigte sich durch eine gleichmäßige Biofilmentwicklung aller observierten Bereiche für die ersten ca. 24 h nach der Inokulation. Zu späteren Zeitpunkten nahm die Dichte nur noch in vorderen Chipabschnitten zu, während in hinteren Bereichen sogar eine Abnahme der Zelldichte beobachtet wurde, was zusammen auf eine sich ausbildende Nährstofflimitierung über den Verlauf des Kanals schließen lässt. Da Sauerstoff dank der hohen Gaspermeabilität des PDMS in ausreichenden Mengen nachdiffundieren sollte ergab sich die Limitierung mit größter Wahrscheinlichkeit durch den Verbrauch der im Minimalmedium befindlichen Substrate. Aufgrund von Substratlimitierungen aufkommende Dichtegradienten finden sich auch in anderen Arbeiten zur Biofilmkultivierung mithilfe fluidischer Systeme (Breugelmans *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2017). Basierend auf den mikroskopischen Daten kann auch auf eine Verschiebung dieser Limitierung über den Verlauf der Kultivierung geschlossen werden. Dies basierte vermutlich auf der Zunahme aktiver Biomasse und eines damit erhöhten Substratverbrauchs in frühen Bereichen des fluidischen Kanals. Dies bedingt auch eine zeitlich-räumliche Verschiebung der ökologischen Nische in den Dimensionen des mikrofluidischen Chips. Der hier beschriebene Prozess sollte sich fortsetzen bis sich ein Gleichgewicht zwischen der Neubildung aktiver Biomasse, beziehungsweise dem Grad der Substrateliminierung, und dem Ab- sowie Austrag der dafür verantwortlichen Biomasse einstellt (Equilibrium).

Dieses Verhalten ist durchaus nicht trivial und wird für die Diskussion späterer Experimente relevant, da es eine Erklärung für das Vorkommen unerwarteter Spezies innerhalb ausgebildeter Nischen eines Biofilms erklären kann. Von besonderer Bedeutung wird dies in der angestrebten Anwendung des Chips als Separierungsplattform, in welcher sich die Organismen in Abhängigkeit der gewählten Gradienten über den Verlauf des fluidischen Kanals Spezies-

spezifisch anreichern sollen. Unter Verwendung geeigneter Analysen, z.B. FISH oder Lebendzellfärbungen, konnte direkt zwischen aktiven (der Nische angehörigen) und inaktiven Organismen unterschieden werden.

Als zweiter innerhalb der Chips auftretende Dichtegradient ergab sich eine unterschiedliche Biomasseverteilung antiparallel zum Mediumsfluss (von „links“ nach „rechts“ innerhalb des mikrofluidischen Kanals). Berücksichtigt man die laminare (turbulenzfreie) Natur des mikrofluidischen Systems basierte diese Verteilung mit aller Wahrscheinlichkeit auf der Inokulation über den zusätzlichen, seitlich-positionierten Zugang und der geringeren Flussrate des Inokulums im Vergleich zum gleichzeitig durchströmenden Medium („5:1-Verteilung“, s. auch Abschnitt 2.5.3). Theoretisch könnte dies zwei parallel verlaufende, turbulenzfreie Ströme bedingen, in welchen nur einer der Beiden Zellen enthält. Besonders für die vorderen Bereiche kommt es so nach der Inokulation zu einer ungleichen Verteilung sedimentierter Zellen und einer daraus resultierenden Differenz in der initialen Biofilmbildung (s. auch Abb. 22). Dieses Verhalten stellt ein weiteres Beispiel für den Einfluss räumlich unterschiedlicher Ausgangszellzahlen nach der Inokulation des Systems dar. Im Verlauf der Kultivierung normalisierte sich das Verhältnis durch die fortschreitenden Biofilmausbreitung zunehmend, sollte jedoch als grundlegende Charakteristik des Aufbaus berücksichtigt werden, da sich dieses Verhalten nicht nur auf Zellen reduzieren lässt, sondern auch für alle weiteren über einen zusätzlich Zugang zugegebenen Substanzen zum Tragen kommt.

Beide zuvor beschriebene Gradienten fanden sich nicht allein in *M. luteus* Mono-Kultivierungen, sondern konnten auch in den Experimenten mit anderen Konsortien beobachtet werden. Damit liegt der Schluss nahe, dass sich es um eine allgemein gültige Charakteristik innerhalb des fluidischen Chips handelt. Dabei ist zu bedenken, dass dieses Verhalten in Abhängigkeit der verwendeten Protokolle steht. In Experimenten ohne Substratlimitierung könnte z.B. durch die Verwendung einer nährstoffreicheren Medienzusammensetzung die Ausbildung eines biologischen Dichtegradienten deutlich reduziert werden. Zusammenfassend konnte bereits anhand dieser ersten Betrachtung des Systems eine potentielle Anwendung als Gradienten-Plattform nachgewiesen werden.

## 4.2 Gezielt Separierung über den Verlauf der Mikrofluidik

Neben universellen Fragen zur Handhabung und Tauglichkeit als Kultivierungssystem wurden im Rahmen der Systemcharakterisierung auch Aspekte gerichteter Biofilmbildung untersucht.

Eine der Kernfunktionen des neuen Systems stellt die über den Kanal verlaufende, selbständige Separierung von Biofilmgemeinschaften dar. Der Grundgedanke hinter der Auftrennung mikrobiologischer Konsortien ist die räumlich unterschiedliche Anreicherung Co-Kultur-abhängiger Mikroorganismen. Dieses Konzept soll neben der Anreicherung und Aufgliederung dieser Organismen auch die Analyse der dafür notwendigen Wachstumsfaktoren erleichtern. Die Kapazität zur Auftrennung mikrobieller Konsortien wurde durch die Kultivierung zweier unterschiedlicher 2-Speziesmodelle untersucht. Hierbei wurde zwischen der Belegung künstlich erzeugter sowie der Selbstgenerierung neuer Nischen unterschieden.

Das erste Modell basierte auf den Organismen *M. luteus* und *P. brassicacearum* und einem über den Kultivierungsverlauf generierten Sauerstoffgradienten (s. auch Abschnitt 3.2). Gezeigt werden sollte die selbstständige Anordnung der Organismen abhängig jeweiliger physiologischer Eigenschaften. *M. luteus* als strikt oxisches Bakterium sollte die, in diesem Aufbau vordere, oxische Nische besetzen, während *P. brassicacearum*, aufgrund seiner fakultativ anaeroben Lebensweise in der Lage ist, auch anoxische Nischen zu belegen. Als zusätzlicher Schritt in der Etablierung des Gesamtsystems dienten die hierbei durchgeführten Experimente ebenfalls zur Validierung der angepassten automatisierten FISH.

Mikroskopisch konnte für Chips mit Sauerstoffgradient eine klare Unterscheidung zwischen vorderen und hinteren Bereichen des fluidischen Kanals ausgemacht werden. Die Ergebnisse bestätigten die erwartete Differenzierung des Konsortiums über den Verlauf des mikrofluidischen Kanals, mit *M. luteus*-Zellen in den vorderen und *P. brassicacearum* in allen Bereichen des Chips. Ohne angebotenen Sauerstoffgradienten konnte keine Auftrennung des Konsortiums gezeigt werden. Tatsächlich zeigte sich in diesen Experimenten sogar im direkten Vergleich zu vorderen Bereichen begaster Chips ein leicht erhöhter Anteil an *M. luteus* Zellen. Anhand der gleichmäßigen Besiedelung dieser unbegasteten Kontrollen kann für begastete Chips von einer Nischenbelegung anhand des angebotenen Sauerstoffgradienten ausgegangen werden. Alle Auswertungen basierten auf der Anwendung des automatisierten FISH-Protokolls. Hierbei erfolgt die Anfärbung von Ribosomen-enhaltener Zellen, womit die Ergebnisse nicht nur eine räumliche Verteilung der Spezies darstellen, sondern tatsächliche, stoffwechselaktive Bereiche angeben.

Die Experimente dienen als Nachweis eines biologischen Gradienten, wobei die Nischenbelegung anhand eines angebotenen Sauerstoffgradienten erfolgte. Der Einfluss von Sauerstoffgradienten auf die Biofilmentwicklung ist umfassend belegt, z.B. in der Evolution von Biofilmgemeinschaften (Koza *et al.*, 2011). Neben dem Nachweis der selbständigen Anordnung der Mikroorganismen ergab sich anhand dieser Experimente auch eine technische Validierung der automatisierten FISH. Darüber hinaus zeigte sich durch diese Experimente die Anwendung von *M. luteus* als möglichen Indikatorstamm zum Nachweis oxidischer Bereiche innerhalb des Chipsystems. Bestätigt wird dies unter anderem durch einen generell höheren *M. luteus*-Anteil in Chips ohne Sauerstofflimitierung.

Neben der selbständigen Anordnung an einen vorgegebenen Gradienten wurde auch die Möglichkeit zur mikrobiologischen Selbstgenerierung biologischer Nischen innerhalb des fluidischen Chips untersucht. Dies erfolgte anhand eines zweiten 2-Speziesmodells, basierend auf den Stämmen *E. coli* und *L. chromiirestans* (s. auch Abschnitt 3.3). Bedingt durch das in der Kultivierung zugesetzte toxische Chromat (Chrom(VI)-Spezies) sollte es zu einer Unterdrückung des *E. coli*-Wachstums kommen, während der Chrom-tolerante *L. chromiirestans* (Sturm *et al.*, 2011) unbeeinflusst anwachsen sollte. Da ein Teil des Resistenzmechanismus von *L. chromiirestans* die Reduktion von Chrom(VI) zum weniger bioverfügbaren Chrom(III) umfasste, bestand die Annahme, dass es im Verlauf der Kultivierung und über die Dimensionen des Kanals hinweg zu einer Verminderung des toxischen Effekts für *E. coli* kommt. Dadurch sollte es diesem ab einem gewissen Zeitpunkt, trotz des konstant in den Chip einkommenden Chromats, möglich sein anzuwachsen.

Zentrale Frage dieser Co-Kulturexperimente war, ob es durch die Anwesenheit von *L. chromiirestans* zu Ausbildung einer möglichen Nische für *E. coli* kommen kann. Experimentell wurde dies mittels paralleler Ansätze unterschiedlicher Chromat-Konzentrationen überprüft. Anwachsene Biofilme wurden durch eine robotergestützte Probenahme und nachfolgender 16S-rDNA Amplicon Sequenzierung sowie einer Endpunktanalyse mittels automatisierter FISH überprüft. Als erste Analyse dieser Art diente dieses Experiment ebenso der Validierung der angepassten roboterunterstützten Probenahme als Möglichkeit entnommene Proben per NGS zu analysieren.

Ohne die Anwesenheit toxischer Chrom(VI)-Spezies kam es entlang des gesamten Chipsystems zu einer deutlichen Dominanz von *E. coli*. Dies wurde sowohl über entnommene Proben für NGS-Analysen, als auch über die finale Mikroskopie nachgewiesen. Die umfassende Ausbreitung von *E. coli* kann durch dessen Möglichkeit zur fakultativ anaeroben Lebensweise

erklärt werden. Durch das gute Wachstum in Vollmedium und der fehlenden Inhibierung durch Chrom(VI), könnte die daraus resultierende Sauerstoffzehrung das Wachstum von *L. chromiiresistens*, welcher strikt aerob ist, unterbinden. Im Sinne antagonistischer Interspeziesinteraktion könnte auch eine Inhibierung von *L. chromiiresistens* aufgrund einer Verschiebung des pH-Wertes durch die Produktion organischer Säuren oder der aktiven Sekretion antagonistischer Wirkstoffe (z. B. Colicine) erfolgen (Rendueles and Ghigo, 2015). In beiden Versuchen kam es ohne den Zusatz von Chrom(VI) zur Ausbildung einer Monokultur mit einer vollständigen Abdeckung zugeordneter Reads der 16S-rDNA Amplicon Sequenzierung zu *E. coli*. Dieses Verhältnis änderte sich drastisch durch die Ergänzung des Vollmediums um 1 mM Chrom(VI). In diesen Ansätzen kam es zu einer mindestens 67%igen Anwesenheit von *L. chromiiresistens* in vorderen Abschnitten co-kultivierter Chips. Über den Verlauf des Kultivierungskanals änderte sich das Verhältnis ab einem bestimmten Punkt wieder zu einer *E. coli* dominierten Gemeinschaft, bei einem mittleren Gesamtanteil von 87,1%. Eine weitere Erhöhung der Chrom(VI)-Konzentration ergab eine stetige Reduzierung des *E. coli* Anteils in hinteren Bereichen der jeweiligen Chips, während sich das Verhältnis in vorderen Abschnitten nahezu gleich verhielt. Ansätze mit 3 mM Chrom(VI) ergaben dabei die höchsten Anteile an *L. chromiiresistens*, mit einer nahezu gleichen Verteilung in vorderen wie hinteren Abschnitten des mikrofluidischen Kanals. Durch diese Experimente bestätigte sich der Einfluss von Chrom(VI) als wachstumslimitierend für *E. coli*. Dieser Einfluss wurde auch bereits in Arbeiten von Ackerley und Kollegen gezeigt, welche eine reduzierte Wachstumsrate in Anwesenheit von 250  $\mu$ M Chromat dokumentieren konnten (Ackerley *et al.*, 2006). Auch die verlängerte Zellmorphologie von bis zu 50  $\mu$ m Chrom-ausgesetzter Zellen deckt sich mit den Beobachtungen von Ackerley und Kollegen. Die Ergebnisse der Chipkultivierungen verdeutlichten zudem die in den Vorexperimenten bestimmte Konzentrationsabhängigkeit des toxischen Chrom(VI) auf das Wachstum von *E. coli*. Hier zeigte sich ein kritischer Konzentrationsbereich zwischen 2 und 2,5 mM. Als limitierende Konzentration wurde dadurch 3 mM festgelegt, bei welcher in mit *E. coli* mono-kultivierten Chips keine Biofilmbildung und keine aktiven Zellen nachgewiesen werden konnten. Chip-Co-Kulturen mit 3 mM Chrom(VI) zeigten neben dem dominierenden *L. chromiiresistens* allerdings auch einige aktive, per FISH detektierte *E. coli*-Zellen. Wie zuvor bereits beschrieben, steigerte sich der Anteil detektierbarer *E. coli*-Zellen mit Abnahme der Chrom(VI)-Konzentration des verwendeten Kultivierungsmediums.

Aufgrund des ähnlichen Spezies-Verhältnisses in vorderen Abschnitten mit Chrom(VI) kultivierter Chips und unter der Berücksichtigung der Ergebnisse der *E. coli*-Mono-

Kulturkontrolle kann hierbei auf eine Abhängigkeit von *E. coli* für die Anwesenheit von *L. chromiirestiens* geschlossen werden.

Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass es innerhalb des fluidischen Systems neben der Belegung angebotener Nischen, wie z. B. im zuvor diskutierten Fall mittels Sauerstoffgradient, auch zur einer durch Mikroorganismen selbstgenerierten Ausbildung unterschiedlicher Nischen über den Verlauf des Kanals kommt. Dies stellt, zusammen mit der zuvor beschriebenen Substratlimitierung in Mono-Kulturexperimenten die dritte Ausbildung eines biologischen Gradienten innerhalb des fluidischen Systems dar und verifiziert dessen Nutzung als Gradientenplattform.

Eine erweiterte Betrachtung der Co-Kulturexperimente mit *E. coli* und *L. chromiirestiens* weist auf die mögliche Ausbildung einer synergistischen Beziehung beider Spezies hin. Die mikroskopische Analyse belegt, dass die Anzahl an *E. coli* Zellen in Ansätzen mit Chrom(VI) nicht schrittweise zunimmt sondern es ab einem bestimmten Punkt, im Verlauf des fluidischen Systems, zu einer abrupten Zellzunahme kommt. Zudem wird in Anwesenheit von *E. coli* auch eine deutlich dichtere Biofilmstruktur ausgebildet. Neben dem zuvor beschriebenen protektiven Einfluss von *L. chromiirestiens* auf *E. coli* zeigt sich anhand dieser Biomassezunahme möglicherweise ein weiterer sozialer Effekt des Co-Kulturbiofilms. Dies wird durch die Beobachtung unterstützt, dass in anderen Bereichen des fluidischen Systems *L. chromiirestiens* Biofilme eine vornehmlich flache, weniger dichte Form und die Ausbildung Streamer-artiger Aggregate aufweisen. Bereiche mit erhöhtem *E. coli*-Anteil weisen neben der erhöhten Masse auch eine durch den Strömungsverlauf weniger beeinflusste Architektur auf. Allerdings kann bereits die Zunahme der Biomasse als Hinweis auf eine synergistische Interaktion gedeutet werden. Auch Ren und Kollegen nutzten die quantifizierte Masse kultivierter Biofilme um eine Aussage über den Grad der jeweiligen synergistischen Wechselwirkung unterschiedlicher Spezies-Kombination festzulegen (Ren *et al.*, 2015). Eine synergistische Wechselwirkung würde auch nicht zwingend in Widerspruch zum dominanten Erscheinungsbild von Kultivierungen ohne Chrom(VI) stehen. Experimente zu kommensalem Wachstum zeigten, dass sich der jeweils konkurrenzfähigste Stamme ohne Druck zur Kooperation durchsetzt (Breugelmans *et al.*, 2008).

Zuvor diskutierte Ergebnisse basierten auf Auswertungen durch die angepassten Analysen der automatisierten FISH, sowie der robotergestützten Probenahme (für Beschreibungen s. auch Abschnitt 2.2). Die Experimente dienten neben dem Nachweis der zweidimensionalen Auftrennung über den Verlauf des Chips auch als *Proof of Concept* der neuentwickelten

Analysen. Es konnte gezeigt werden, dass diese entsprechend ihrer Anwendung funktionierten. Für die automatisierte FISH konnte dies bereits durch Hansen und Kollegen anhand einzeln und co-kultivierter *E. coli* / *B. subtilis* Modelle gezeigt werden (Hansen *et al.*, 2017). In dieser Arbeit wurde dies durch die Unterscheidung unterschiedlicher Nischenbelegung innerhalb eines Sauerstoffgradienten zusätzlich verifiziert. Die Methode ermöglicht eine detaillierte Untersuchung der räumlichen Anordnung, sowie der morphologischen und physiologischen Zustände von Zellen in Biofilmgemeinschaften. Des Weiteren wurde anhand des 2-Speziesmodells *E. coli* / *L. chromiirensistens* erstmals überprüft, ob es möglich ist, robotergestützt Proben direkt aus dem Chip zu entnehmen und per NGS zu analysieren. Auch dies konnte in dieser Arbeit belegt werden und so generierte Daten wurden anhand mikroskopischer Analysen verifiziert. Das entnommene Volumen von 10 µl entsprach (mit einer kalkulierten Kanalstrecke von 8,75 mm vor und hinter der Einstichstelle) einem relativ großen Einzugsbereich innerhalb des fluidischen Systems. Entnommene Proben stellten dadurch einen Mittelwert der Biofilmmzusammensetzung dieser Bereiche dar. Diese Bereiche werden allerdings durch die gewählten Parameter definiert und können noch weiter eingengt werden. Zum einen erwies sich das entnommene Volumen als großzügig, da im weiteren Verlauf der Analyse nur 1 µl Probe benötigt wurde. Sollte es vor einer weiteren Analyse zudem möglich sein die Probe zu verdünnen, würde sich der Bedarf weiter reduzieren. Auch die gewählte Kultivierungsgeschwindigkeit zeigt großen Einfluss auf den Einzugsbereich der Probenahme. Für Kultivierungen mit höheren Geschwindigkeiten ergibt sich demnach ebenfalls eine weitere Einengung des Einzugsbereichs. Probeentnahmen stellen keine Endpunktanalysen dar und sind damit in ihrer Anwendung flexibler als die räumlich besser auflösende FISH, womit sie eine Erweiterung des Analysepools zur zeitlich-räumlichen Biofilmbildung darstellen. Dies umfasst nicht nur die Bestimmung der Diversität an spezifischen Punkten des Chips, sondern auch die Anwendung zur Analyse von Wachstumsfaktoren über den Verlauf des Kanals.

Die kontrollierte Darstellung von Gradienten, wie den bereits beschriebenen Sauerstoffgradienten, wird teilweise auch von anderen mikrobiologischen Kultivierungssystemen, wie aus Arbeiten von Skolimowski und Kollegen, angeboten (Skolimowski *et al.*, 2010). Ein Vorteil gegenüber diesen Systemen stellt neben dem modularen Aufbau des Systems die mögliche Autoklavierbarkeit der Chips dar. Diese günstige und gängige Methode bietet sich besonders zugunsten der Reproduzierbarkeit langsam wachsender und langzeitkultivierter Stämme an, da nach der Sterilisation keine chemischen Rückstände hinterlassen werden.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zur gerichteten Biofilmkultivierung ermöglichen die Anwendung des Chipsystems als Gradienten-basierte Kultivierungsplattform bisher unkultivierbarer Mikroorganismen.

### 4.3 UV-C Strahlung zur nicht invasiven Biofilmmanipulation

Vorangegangene Experimente fokussierten sich auf die Biofilmbildung in Abhängigkeit von systemintern ausgebildeten Nischen. Nach dem Beweis einer Gradientenbildung durch die geeignete Wahl der Prozessparameter, sollte das Anwendungspotential der neuen Plattform um eine kultivierungsunabhängige Manipulation durch externe Faktoren erweitert werden. Der strahlungsdurchlässige Aufbau ermöglichte eine nichtinvasive Manipulation durch die Anwendung energiereicher Strahlung, wie der UV-Strahlung. Dadurch sollte auch eine biotechnologische Nutzung als Mutagenese-Plattform ermöglicht werden.

Um die Manipulierbarkeit des Systems per UV-Strahlung zu überprüfen sollten frisch inokulierte Zellen innerhalb des Systems unterschiedlicher Bestrahlung an UV-C ausgesetzt werden und sich daraus entwickelnde Biofilme quantitativ verglichen werden. Zur vereinfachten quantitativen Analyse des gesamten Biofilms war es notwendig das Set an existierenden Analysetools der Kultivierungsplattform zu erweitern. Dies erfolgte durch die Etablierung einer Gesamtkanal-Absorptionsmessung im Rahmen der Masterarbeit von Sebastian Schieß (Schieß, 2017).

Experimente zur Untersuchung des Einflusses von UV-C Strahlung auf die Biofilmbildung erfolgten mit *E. coli* und einem Substrat-reduziertem Vollmedium. Durch die provozierte Substratlimitierung bildete sich ein Biofilm mit abnehmender Dichte über den Verlauf des Kanals aus (wie bereits für *M. luteus* beschrieben, s. auch Abschnitt 4.1). Chips wurden nach der Inokulation für 5 min, 10 min sowie 20 min mit UV-C bestrahlt - 5 min entsprachen dabei der notwendigen Bestrahlung zur  $10^4$ -fachen Reduzierung der Zellzahl bei der Trinkwasserdesinfektion ( $20 \text{ mJ/cm}^2$ , s. auch Guerrero-Beltrán and Barbosa-Cánovas (2004)). Ausgehend von der gesteigerten Bestrahlung bildeten sich unterschiedlich dichte Biofilme innerhalb des mikrofluidischen Systems aus. Der durch die Substratlimitierung bedingte Gradient zeigte sich sowohl für bestrahlte als auch unbestrahlte Chips, mit einer geringeren Zellzahl bei Chips mit höherer Bestrahlung. Die Höhe der Bestrahlung verhielt sich dabei nicht linear zum Umfang des inhibierten Zellwachstums (s. auch Abb. 30). Dies deckt sich mit Werten und Modellen der Literatur, wodurch sich eine Verdopplung der Bestrahlung nicht in einer verdoppelten absoluten Zahl gehemmter Zellen widerspiegelt (Labas *et al.*, 2005).

Die Ergebnisse zeigten eine klare Manipulierbarkeit sich entwickelnder Biofilme durch die Verwendung von UV-C Strahlung. Das neu entwickelte System stellt damit eine potentiell nicht invasive Möglichkeit zur Manipulation und UV-Mutagenese von Zellen innerhalb des mikrofluidischen Chips dar. Die systemintegrierte Bestrahlung ermöglicht eine direkte

Weiterkultivierung, ohne die Notwendigkeit des Zelltransfers, weshalb, abhängig der gewählten Fragestellung, direkt mit der nachgeschalteten Kultivierungs- beziehungsweise Screening-Phase begonnen werden kann.

Die neu etablierte Absorptionsmessung diene dabei erfolgreich der Unterscheidung kultivierter Biofilme abhängig einer unterschiedlichen initialen Bestrahlung. Durch die Etablierung der Gesamtchipanalyse ermöglicht sich auch ein Ausbau des existierenden Analysepools basierend auf spektroskopischen Analysemethoden. Ein Beispiel wäre die Etablierung eines integrierten, flächendeckenden O<sub>2</sub>-Sensor wie aus dem System von Skolimowski und Kollegen (Skolimowski 2010). Hierbei wird eine zusätzliche Silikonschicht mit einem Metalloporphyrin (in diesem Beispiel: PtOEP) mit dem Kultivierungskanal gekoppelt. Durch messen der dynamischen Fluoreszenzlöschung des Metalloporphyrin durch elementaren Sauerstoff kann dieser dadurch quantifiziert werden (Carraway *et al.*, 1991).

#### 4.4 Stammoptimierung durch fluidische Biofilmkultivierung

Durch die konstanten Wachstumsbedingungen innerhalb des fluidischen System ermöglicht dies selektive Langzeitkultivierungen. Damit besteht für das mikrofluidische System eine Anwendung als Screening-Plattform zur Generierung neuer, biotechnologisch relevanter Stämme.

Dies geschah am Beispiel des Gärungs-defizienten Stammes JG806. Dieser *E. coli*-Stamm wurde durch die Ausschaltung aller Gärstoffwechselprozesse als Ausgangsstamm für die Produktion von Plattformchemikalien optimiert (Förster *et al.*, 2017). Diese können neben der klassischen auch über die sogenannte unstöchiometrische Fermentation dargestellt werden. Bei letzterer ist es dem Produktionsorganismus, durch die externe Regeneration von Reduktionsäquivalenten an einer angebotenen Elektrode möglich höher oxidierte Gärprodukte zu generieren. Für nicht-nativ exoelektrogene Stämme wird die erforderliche Interaktion mit der extrazellulär liegenden Elektrode über Elektronenmediatoren ermöglicht. Das Phenothiazin-Derivat Methylenblau stellt ein Beispiel eines solchen Mediators dar. Obwohl im Rahmen der Forschungsprojekte der AG Gescher mittlerweile als Standard-Elektronenmediator verwendet, hat Methylenblau auch eine nachweislich genotoxische Wirkung und schädigt in geringem Ausmaß die äußeren Membranen von Mikroorganismen (Tuite and Kelly, 1993; Usacheva *et al.*, 2001). Zum Zeitpunkt dieser Arbeit wurde der Elektronenmediator nicht über eine Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  genutzt (Förster *et al.*, 2017). Durch die Erhöhung der verwendeten Mediatorkonzentration würde es allerdings zu einer deutlichen Steigerung der möglichen Elektronenabgabe an die Elektrode kommen (Beblawy, nicht publiziert).

Mit diesem Hintergrund sollte das Chipsystem dazu genutzt werden neue Stämme mit einer erhöhten Toleranz gegenüber Methylenblau zu generieren. Da mit dem System die flexible Verknüpfung einzelner Chipkomponenten möglich ist, war der Grundgedanke einen Aufbau mit stufenweiser Steigerung der Methylenblaukonzentration zu entwickeln. Dadurch sollten unterschiedliche Nischen über den Strömungsverlaufs der Kultivierungsplattform angeboten werden (Gradienten-basierte Selektionsplattform). Kombiniert mit dem Prinzip der adaptiven Evolution, welches besonders innerhalb von Biofilmgemeinschaften zu Tragen kommt (Martin *et al.*, 2016), sollte es so zu einer Entwicklung neuer Stammvarianten im Verlauf der Kultivierung kommen.

Die Gewinnung neuer Stammvarianten erfolgte hauptsächlich über Probenahmen des Durchflusses, in welchem sich durch natürliche oder strömungsbedingte Freisetzung beständig Zellen des Biofilms befanden. Gesammelte und frisch angezogen Zellen wurden in einem

Vorscreening auf ihre Toleranz gegenüber Methylenblau untersucht. Dies umfasste die Wachstumsrate und maximale optische Dichte in Anwesenheit unterschiedlicher Methylenblaukonzentrationen. Hierbei konnten zwischen den neuen Stammvarianten unterschiedliche Phänotypen dokumentiert werden. Die Ergebnisse waren innerhalb von Replikaten stets konsistent, weswegen Unterschiede im dokumentierten Verhalten auf tatsächliche phänotypische Unterschiede der neuen Stammvarianten hinwiesen. Die Stammvarianten wurden stets mit dem Phänotyp des Ausgangsstammes abgeglichen. Aus diesen ersten Versuchen wurden zwei Stammvarianten, im weiteren Verlauf der Arbeit „F2“ und „C8“ benannt, ausgewählt, welche aufgrund ihrer maximalen optischen Dichte und erhöhten Wachstumsrate einen vielversprechenden Ansatz für die weitere Charakterisierung des methylenblautoleranten Phänotyps darstellten. Die Variante F2 wurde gewählt, da sie ein konstant gutes Wachstum in allen getesteten Methylenblaukonzentrationen aufwies, wohingegen C8, neben dem ebenfalls verbesserten Wachstum in Anwesenheit von Methylenblau, eine deutlich erhöhte maximale optische Dichte zeigte.

Der im Screening dokumentierte Phänotyp beider Stammvarianten wurde durch zusätzliche Kultivierungen im Erlenmeyerkolben-Maßstab verifiziert. Diese und alle weiteren Charakterisierungsexperimente erfolgten stets mit einer parallelen Kultivierung des Ausgangsstammes als Kontrolle. Für diesen konnte für die gewählten Methylenblaukonzentrationen von 400  $\mu\text{M}$  und 1200  $\mu\text{M}$  kein Wachstum dokumentiert werden. Die F2-Variante zeigte bereits ohne Methylenblau eine leicht erhöhte Wachstumsrate im Vergleich zum Ausgangstamm, allerdings konnte auch in Anwesenheit von 400  $\mu\text{M}$  Methylenblau noch eine erhöhte Wachstumsrate dokumentiert werden. Die Variante C8 zeigte ebenfalls bei beiden Methylenblaukonzentration ein stetiges Wachstum mit einer etwa halb so großen Rate bei 400  $\mu\text{M}$  wie sie für die F2-Variante dokumentiert werden konnte, allerdings ergab sich für Kultivierungen mit 1200  $\mu\text{M}$  in etwa dieselbe Rate. Als Fazit zeigte sich für beide neuen Stammvarianten ein Wachstum in Anwesenheit von Methylenblau mit einer erhöhten Wachstumsrate für F2 und einer höheren absoluten optischen Dichte für C8. Die Ergebnisse deckten sich in ihrer Kernaussage mit den Ergebnissen des vorgeschalteten Screenings. Die dokumentierte Toleranz stellte eine eindeutige Steigerung dar, da Werte aus der Literatur bereits einen letalen Einfluss auf verschiedene *E. coli*-Stämme bei Konzentrationen zwischen 150 - 250  $\mu\text{M}$  nachweisen (Usacheva et al., 2001).

Damit ausgeschlossen werden konnte, dass die neuerworbene Toleranz nicht auf einer verringerten Reduktion von Methylenblau (z.B. durch eine verminderte Permeabilität des Elektronenmediators) erfolgt, wurde diese in einem speziell etablierten Assay untersucht. Auf

Basis der ermittelten Reduktionskinetik ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den getesteten Varianten und des Ausgangsstammes. Dies zeigte, dass der neuerworbene Resistenzmechanismus nicht zu Kosten der Methylenblaureduktion erworben wurde.

Durch den Nachweis einer unveränderten Reduktionskinetik der methylenblautoleranteren Stämme kann von einer erfolgreichen Generierung bioelektrochemisch nutzbarer Stammvarianten durch die speziell dafür angepasste Screeningplattform geschlossen werden. Da dies die erste erfolgreiche Stammgenerierung durch das modulare System darstellt, entspricht dieses Experiment gleichzeitig dem *Proof of Concept* der Generierung neuer Stammvarianten per mikrofluidischer Biofilmkultivierung.

Final wurde die Stromproduktion der F2-Variante in einer mikrobiellen Brennstoffzelle getestet. Methylenblau wurde, im Vergleich zum gängigen Standard, in einer deutlich erhöhten Konzentration von 550  $\mu\text{M}$  verwendet. Dies entsprach dem doppelten des  $K_m$ -Wertes, welcher in parallel zu dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zur Optimierung der Prozessparameter des bioelektrochemischen Systems bestimmt wurde (Beblawy, nicht publiziert). Durch Verwendung dieser Konzentration sollte Methylenblau als limitierender Faktor der bioelektrochemischen Redoxreaktion ausgeschlossen werden. Zusätzlich wurde zur schnelleren Regenerierung der Mediatoren ein erhöhtes Potential an der Anode angelegt. Die neue Stammvariante zeigte nach einer etwa sechsständigen lag-Phase einen Anstieg in der Stromproduktion auf. Der final (nach der Adaption) produzierte Strom der neuen Stammvariante entsprach dem 2,5fachen des Stroms des Ausgangsstammes, welcher über den gesamten Experimentverlauf bei gemittelten 40  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  lag. Die beschriebene lag-Phase der F2-Variante basierte möglicherweise auf der Adaption des Stammes an die in der Brennstoffzelle herrschenden Kultivierungsbedingungen. Berücksichtigt man die Sensitivität des Ausgangsstammes gegenüber Methylenblaukonzentrationen höher 400  $\mu\text{M}$  (s. auch Abb. 33(A)), ist es sehr Wahrscheinlich, dass es auch nur der F2-Variante möglich war sich an die neuen Prozessparameter zu adaptieren.

Zur Untersuchung des genomischen Hintergrunds der neuen Stammeigenschaften wurde für die Stammvarianten F2 und C8 eine Genomsequenzierung mit anschließender Variantenanalyse durchgeführt. Für C8 ergab sich keine Mutation in annotierten Bereichen des Genoms, allerdings teilen sich beide Stammvarianten eine Insertion in einem noch unbekanntem Gen, dessen Einfluss auf den Phänotyp daher nicht diskutiert werden kann. Als Unterschied zu F2 ergab sich für C8 eine weitere Mutation in einem nicht-codierenden Bereich downstream des

Gens der Untereinheit von Typ-I-Pili (*fimA*; Subramanya *et al.*, 1997). Ein möglicher, regulatorischer Einfluss des Mutationsereignisses auf die Expression von Typ-I-Pili ist nicht bekannt, allerdings stellen diese einen wichtigen Faktor in der initialen Biofilmbildung dar (O'Toole and Kolter, 1998b). Im Falle eines Einflusses auf die Biofilmbildung könnte dies einen Hinweis auf die erhöhte optische Dichte in Kultivierungsexperimenten mit der Stammvariante C8 geben.

Für F2 ergaben sich zwei Stammvariationen in annotierten Bereichen des Genoms. Zum einen ein Einzelnukleotid-Polymorphismus in *aceF*, dem Gen codierend für die E2-Untereinheit der Pyruvat-Dehydrogenase, sowie eine Deletion mit Rasterverschiebung in *acrR*, einem Gen welches den Regulator AcrR codiert. Auch wenn durch die Punktmutation in *aceF* ein Verlust der Pyruvat-Dehydrogenase unwahrscheinlich erscheint, zeigte sich, in zu dieser Arbeit unabhängigen Stammoptimierungsexperimenten (Beblawy, nicht publiziert), Hinweise auf ein optimiertes Wachstum des Stammes.

Ein direkt nachvollziehbarer Effekt ergibt sich für die dokumentierte Mutation in *acrR*. AcrR ist ein autoregulierter Repressor des *acrAB*-Operons, welches für eine Effluxpumpe codiert (Ma *et al.*, 1996). Als sekundärer Modulator verhindert *acrR* die ungewollte Überproduktion von *acrAB*. Die Deletion in *acrR* führt aufgrund der Leserasterverschiebung, aller Wahrscheinlichkeit nach zur Expression eines nicht funktionalen Repressors, was zu einer Überfunktion des AcrAB-Apparates führen würde. Der Einfluss von Effluxpumpen als genereller Resistenzmechanismus gegen multiple antimikrobielle Wirkstoffe ist umfassend belegt (Martinez *et al.*, 2009; Blanco *et al.*, 2016). Für AcrA ergibt sich bereits in frühen Arbeiten ein dokumentierter Zusammenhang zur Methylenblautoleranz von *E. coli* (Sugino, 1966; Henson and Walker, 1982). Hierbei zeigte sich, dass  $\Delta$ *acrA*-Mutanten eine erhöhte Sensibilität gegenüber Methylenblau aufweisen. In diesen Arbeiten konnte für methylenblausensitive Stämme bereits für Konzentrationen ab 30  $\mu$ M (pH-abhängig) kein Wachstum mehr dokumentiert werden (Sugino, 1966).

Die Vermutung, dass der zugrundeliegende Mechanismus der erhöhten Methylenblautoleranz auf aktivem Ausschluss des Elektronenmediators basiert, wird durch mikroskopische Beobachtungen während der Wachstumsexperimente unterstützt. Für den Ausgangsstamm wurde dabei eine deutliche Zellverfärbung dokumentiert, während die Zellen der F2-Variante auch bei hoher Methylenblaukonzentration keine Farbveränderung zeigten. Dies lässt entweder auf eine Impermeabilität der Zellen oder ein aktives Ausschleusen des Elektronenmediators schließen. Eine erfolgreiche Aufnahme, beziehungsweise Reduktion, des Elektronenmediators

konnte allerdings anhand des Reduktionsassay betätigt werden. Dadurch ergibt sich als mögliches Modell für den Toleranzmechanismus der F2-Variante, dass die Zellen zwar zugänglich für Methylenblau sind und der Elektronenmediator periplasmatisch reduziert wird, das Cytoplasma mit dem Genom als möglichen Angriffspunkt (Tuite and Kelly, 1993) allerdings frei von Methylenblau bleibt. Dies deckt sich auch mit der Aussage von Usacheva und Kollegen, dass die bakterizide Wirksamkeit abhängig von der Methylenblaukonzentration im Zellinneren ist (Usacheva *et al.*, 2001)

Zusammengefasst zeigte der F2-Phänotyp eine Steigerung in der Methylenblautoleranz, der allgemeinen Wachstumsrate sowie, in Kombination mit einer erhöhten Mediatorkonzentration, der Stromproduktion in einer mikrobiellen Brennstoffzelle. Die Deletion des Regulators AcrR stellt darüber hinaus einen attraktiven Ansatz zur gezielten Generierung neuer, methylenblautoleranter Stammvarianten für die Anwendung in bioelektrochemischen Systemen dar.

Mit der Kombination aus kontinuierlicher Kultivierung, nicht-invasiver Manipulation und einer umfassenden Analyseinfrastruktur stellt die neue Plattform ein wirksames Werkzeug zur Generierung neuer Stämme in Langzeitkultivierungsexperimenten dar. Der große Vorteil liegt unter anderem im kontinuierlichen Betrieb des Systems, womit eine nahezu endlose Schleife multipler Adaptionsergebnisse mit der flexiblen Manipulation der Nischenzusammensetzung innerhalb des Systems kombiniert werden kann. Da für die Gewinnung neuer Stammvarianten die laufende Kultivierung nicht unterbrochen werden muss, kann das System zur kontinuierlichen Generierung neuer Stammvarianten betrieben werden. Da es in einem fluidischen System auch immer zum Abtrag größerer Biofilmaggregate kommt (Stoodley *et al.*, 2001), werden durch Probenahmen per Durchfluss nicht nur planktonisch lebende Zellen gesammelt. Dadurch umfasst eine solche Probe auch immer Zellen mit einer Biofilm-bezogenen Physiologie. Im Rahmen langzeitbetriebener Stammoptimierungen sind allerdings auch planktonische Zellen von Interesse, da deren Ursprung ab einem gewissen Zeitpunkt nur noch dem selektivgebildeten Biofilm entsprechen kann. Umfasst die Fragestellung eine stabile Genommutation, ohne dass dabei die Möglichkeit der planktonischen Lebensweise unterbunden wird, entsprechen diese Zellen ebenso den gewünschten Kriterien.

## 4.5 Ausblick

Die vorliegende Arbeit umfasst die multifaktorielle Charakterisierung und Optimierung eines neuen mikrofluidischen Chipsystems. Neben der Handhabung und allgemeinen Biofilmbildung unter oxidischen und anoxischen Bedingungen, erfolgte eine umfassende Validierung speziell angepasster Methoden sowie biotechnologischer Anwendungsmöglichkeiten. Dies umfasste die technische Validierung des automatisierten FISH-Protokolls, der Probenahme inklusive kombinierter NGS-Analyse, der Gesamtkanal-Absorptionsmessung sowie Nachweise gerichteter Biofilmbildung, möglicher Manipulation Chip-interner Zellen mittels energetischer Strahlung und der Nutzung des Systems zur Stammgenerierung per adaptiver Evolution.

Das System konnte umfassend als Biofilmkultivierungsplattform etabliert werden. Im Gegensatz zu vielen, oftmals hochspezialisierten, Systemen ergibt sich durch die einfache Kombination unterschiedlicher Module zusätzlich eine äußerst flexible Anpassung an verschiedene Fragestellungen. Als methodische Ergänzung bietet sich auch die Anbindung einer Durchflusszytometrie an. Durch die Kombination unterschiedlicher fluoreszenzbasierter Markierungen, wie der Lebendzellfärbung oder der Antikörpermarkierung, könnte es so zu einer detaillierten Analyse der Biofilmgemeinschaft mittels direkter Probenahme kommen, ohne die Kultivierung des Gesamtsystems unterbrechen zu müssen. Auch eine Automatisierung der Gesamtkanal-Absorptionsmessung ähnlich zu der bereits etablierten automatisierten FISH würde die Analyseinfrastruktur des Systems enorm erweitern. Würde ein solches System zusätzlich mit der robotergestützten Probenahme kombiniert, ergäbe sich die Möglichkeit Chips automatisch zu scannen, interessante Bereiche (aufgrund erhöhter Dichte oder eines fluoreszenten Signals) zu lokalisieren und automatisiert und zielgerichtet Proben zu entnehmen.

Neben einer möglichen Erweiterung der Infrastruktur ergeben sich, anhand der etablierten Plattform und der Erfahrungen durch die bereits durchgeführten Validierungsexperimente, auch eine Reihe neuer Projektansätze.

Das System könnte in einem, zu den UV-C-Experimenten analogen, Ansatz mit parallelen Chip-Kultivierungen, dazu genutzt werden, den Einfluss unterschiedlicher Biofilm-inhibierender Wirkstoffe zu testen. Hierbei könnte z.B. der konzentrationsabhängige Einfluss unterschiedlicher Quorum quenching Signalmoleküle auf sich entwickelnde oder bereits ausgebildete Biofilme untersucht werden.

Ein interessante Idee für zukünftige Stammentwicklungen stellt der Aspekt Co-Kultur-getriebener Evolution dar (Hansen *et al.*, 2007). Hansen und Kollegen konnten zeigen, dass

eine 2-Spezies-Kultivierung neue Stammvarianten hervorbrachte, welche in Mono-Kultivierungen innerhalb des gleichen Zeitraums nicht auftraten. Auf dieser Basis könnte ein mehrstufiges System generiert werden, welches über unterschiedliche, nacheinander durchströmte Module, die Evolution-antreibende Co-Kultivierung und die anschließende Selektion umfasst. Neben dem Aspekt der Co-Kultur getriebenen Evolution, kombiniert sich diese Idee in der Biofilmplattform auch mit der gesteigerten Kompetenz innerhalb von Biofilmen (Hausner and Wuertz, 1999). Dadurch eröffnet sich auch die Idee einer Konjugations-Plattform. Hierbei könnte in einem ersten Chip die Co-Kultur-bedingte Konjugation stattfinden und in einem direkt angekoppelten Chip auf die ausgewählten Marker selektiert werden. Die konstante, fluidische Co-Kultivierung und Selektion ermöglicht eine deutlich längere Konjugation und dadurch möglicherweise auch die Modifikation ansonsten genetisch schwer zugänglicher Stämme.

Ergänzend zur Stammgenerierung, sind Biofilme sowohl gute Modelle, um die Bedeutung sozialer Interaktionen zu verstehen, als auch zu untersuchen wie diese Interaktionen in Zeit und Raum gestaltet sind (Martin *et al.*, 2016). Dies trifft besonders auf Experimente mit Multispeziesbiofilmen zu (Liu *et al.*, 2017) und führt damit zur Reflektion der ursprünglichen Idee, das fluidische System zur Co-Kultivierung bisher unkultivierbarer Mikroorganismen zu nutzen. Mit dem Nachweis der biologischen Gradientenbildung und der neuetablierten, umfangreichen Analysemöglichkeiten ergeben sich die besten Voraussetzungen für genau diese Form der Anwendung. Anhand möglicher Langzeitkultivierungen mit Substrat-reduziertem Medium eröffnet sich neben der Anreicherung co-kultivierter Mikroorganismen auch eine Adressierung langsam wachsender Mikroorganismen. Durch die Kombination nachgeschalteter Chips zur Begasung des Systems oder mit zusätzlichen Anschlüssen zur Substratversorgung, kann die Nischenbildung über den Verlauf des (verlängerten) Kultivierungskanals zusätzlich manipuliert werden. Dies macht das System, über die ursprüngliche Idee einer Co-Kulturplattform hinaus, zu einem allgemein anwendbaren System zur Kultivierung des kultivierbaren und unkultivierbaren Mikrokosmos.

## 5. Referenzen

Absalon, C., Dellen, K. van, and Watnick, P.I. (2011) A communal bacterial adhesin anchors biofilm and bystander cells to surfaces. *PLoS Pathog* **7**.

Achouak, W., Conrod, S., Cohen, V., and Heulin, T. (2004) Phenotypic Variation of *Pseudomonas brassicacearum* as a Plant Root-Colonization Strategy. *Mol Plant-Microbe Interact* **17**: 872–879.

Achouak, W., Sutra, L., Heulin, T., Meyer, J., Fromin, N., Degraeve, S., *et al.* (2000) *Pseudomonas brassicacearum* sp. nov. and *Pseudomonas thivervalensis* sp. nov., two root-associated bacteria isolated from *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**: 9–18.

Ackerley, D.F., Barak, Y., Lynch, S. V., Curtin, J., and Matin, A. (2006) Effect of Chromate Stress on *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **188**: 3371–3381.

Amann, R., and Fuchs, B.M. (2008) Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nat Rev Microbiol* **6**: 339–48.

Ankeny, R.A., and Leonelli, S. (2011) What's so special about model organisms? *Stud Hist Philos Sci* **42**: 313–323.

Arslan, E., Schulz, H., Zufferey, R., Künzler, P., and Thöny-Meyer, L. (1998) Overproduction of the *Bradyrhizobium japonicum* c-type cytochrome subunits of the cbb3 oxidase in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **251**: 744–747.

Asayesh, F., Zarabadi, M.P., and Greener, J. (2017) A new look at bubbles during biofilm inoculation reveals pronounced effects on growth and patterning. *Biomicrofluidics* **11**.

Augustine, N., Kumar, P., and Thomas, S. (2010) Inhibition of *Vibrio cholerae* biofilm by AiiA enzyme produced from *Bacillus* spp. *Arch Microbiol* **192**: 1019–1022.

Azeredo, J., Azevedo, N.F., Briandet, R., Cerca, N., Coenye, T., Costa, A.R., *et al.* (2017) Critical review on biofilm methods. *Crit Rev Microbiol* **43**: 313–351.

Bagge, N., Hentzer, M., Andersen, J.B., Ciofu, O., Givskov, M., and Høiby, N. (2004) Dynamics and Spatial Distribution of  $\beta$ -Lactamase Expression in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 1168–1174.

- Balaban, N.Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L., and Leibler, S. (2004) Bacterial Persistence as a Phenotypic Switch. *Science* (80- ) **305**: 1622–1625.
- Balzer, M., Witt, N., Flemming, H.C., and Wingender, J. (2010) Faecal indicator bacteria in river biofilms. *Water Sci Technol* **61**: 1105–1111.
- Battin, T.J., Kaplan, L.A., Newbold, J.D., and Hansen, C.M.E. (2003) Contributions of microbial biofilms to ecosystem processes in stream mesocosms. *Nature* **426**: 439–442.
- Beblawy, S., Bursac, T., Paquete, C., Louro, R., Clarke, T.A., and Gescher, J. (2018) Extracellular reduction of solid electron acceptors by *Shewanella oneidensis*. *Mol Microbiol* **109**: 571–583.
- Becker, J., and Wittmann, C. (2015) Advanced Biotechnology: Metabolically Engineered Cells for the Bio-Based Production of Chemicals and Fuels, Materials, and Health-Care Products. *Angew Chemie - Int Ed* **54**: 3328–3350.
- Beech, I.B., and Sunner, J. (2004) Biocorrosion: Towards understanding interactions between biofilms and metals. *Curr Opin Biotechnol* **15**: 181–186.
- Beer, D. de, Schramm, A., Santegoeds, C.M., and Kühl, M. (1997) A Nitrite Microsensor for Profiling Environmental Biofilms. *Appl Environ Microbiol* **63**: 973–977.
- Beer, D. de, Stoodley, P., Roe, F., and Lewandowski, Z. (1994) Effects of Biofilm Structures on Oxygen Distribution and Mass Transport. *Biotechnol Bioeng* **43**: 1131–1138.
- Blanco, P., Hernando-Amado, S., Reales-Calderon, J., Corona, F., Lira, F., Alcalde-Rico, M., *et al.* (2016) Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants. *Microorganisms* **4**: 1–19.
- Blauert, F., Horn, H., and Wagner, M. (2015) Time-resolved biofilm deformation measurements using optical coherence tomography. *Biotechnol Bioeng* **112**: 1893–1905.
- Bos, R., Mei, H.C. Van Der, and Busscher, H.J. (1999) Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions - its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiol Rev* **23**: 179–230.
- Breugelmans, P., Barken, K.B., Tolker-Nielsen, T., Hofkens, J., Dejonghe, W., and Springael, D. (2008) Architecture and spatial organization in a triple-species bacterial biofilm synergistically degrading the phenylurea herbicide linuron. *FEMS Microbiol Ecol* **64**: 271–282.

- Bullen, R.A., Arnot, T.C., Lakeman, J.B., and Walsh, F.C. (2006) Biofuel cells and their development. *Biosens Bioelectron* **21**: 2015–2045.
- Burmølle, M., Thomsen, T.R., Fazli, M., Dige, I., Christensen, L., Homøe, P., *et al.* (2010) Biofilms in chronic infections - A matter of opportunity - Monospecies biofilms in multispecies infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* **59**: 324–336.
- Carraway, E.R., Demas, J.N., and DeGraff, B.A. (1991) Luminescence Quenching Mechanism for Microheterogeneous Systems. *Anal Chem* **63**: 332–336.
- Castellani, A.S., and Chalmers, A.J. (1919) *Manual of Tropical Medicine*. 3rd ed., Bailliere, Tindall & Cox, London.
- Ceri, H., Olson, M.E., Stremick, C., Read, R.R., Morck, D., and Buret, A. (1999) The Calgary Biofilm Device: New technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* **37**: 1771–1776.
- Chagnot, C., Zorgani, M.A., Astruc, T., and Desvaux, M. (2013) Proteinaceous determinants of surface colonization in bacteria: bacterial adhesion and biofilm formation from a protein secretion perspective. *Front Microbiol* **4**.
- Chai, Y., Chu, F., Kolter, R., and Losick, R. (2008) Bistability and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **67**: 254–263.
- Chaudhuri, R.R., and Henderson, I.R. (2012) The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. *Infect Genet Evol* **12**: 214–226.
- Chaudhuri, S.K., and Lovley, D.R. (2003) Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. *Nat Biotechnol* **21**: 1229–1232.
- Chiang, W.-C., Nilsson, M., Jensen, P.Ø., Højby, N., Nielsen, T.E., Givskov, M., and Tolker-Nielsen, T. (2013) Extracellular DNA Shields against Aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **57**: 2352–2361.
- Claessen, D., Rozen, D.E., Kuipers, O.P., Søgaaard-Andersen, L., and Wezel, G.P. Van (2014) Bacterial solutions to multicellularity: A tale of biofilms, filaments and fruiting bodies. *Nat Rev Microbiol* **12**: 115–124.
- Costerton, J.W. (1999) Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents* **11**: 217–221.
- Costerton, J.W., Cheng, K.-J., Geesey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M., and Marrie, T.J. (1987) Bacterial Biofilms in Nature and Disease. *Annu Rev Microbiol* **41**: 435–

464.

Costerton, J.W., Geesey, G.G., and Cheng, K.-J. (1978) How Bacteria Stick. *Sci Am* **238**: 86–95.

Croxen, M.A., and Finlay, B.B. (2010) Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* **8**: 26–38.

Crusz, S. a, Papat, R., Rytbke, M.T., Cámara, M., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., *et al.* (2012) Bursting the bubble on bacterial biofilms: a flow cell methodology. *Biofouling* **28**: 835–842.

D’Argenio, V., and Salvatore, F. (2015) The role of the gut microbiome in the healthy adult status. *Clin Chim Acta* **451**: 97–102.

Daddi Oubekka, S., Briandet, R., Fontaine-Aupart, M.P., and Steenkeste, K. (2012) Correlative Time-Resolved Fluorescence Microscopy To Assess Antibiotic Diffusion-Reaction in Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **56**: 3349–3358.

Damgaard, L.R., Nielsen, L.P., and Revsbech, N.P. (2001) Methane microprofiles in a sewage biofilm determined with a microscale biosensor. *Water Res* **35**: 1379–1386.

Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W., and Greenberg, E.P. (1998) The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm. *Science* **280**: 295–298.

Decho, A.W., Visscher, P.T., and Reid, R.P. (2005) Production and cycling of natural microbial exopolymers (EPS) within a marine stromatolite. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* **219**: 71–86.

Demain, A.L., and Sanchez, S. (2009) Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J Antibiot (Tokyo)* **62**: 5–16.

Dong, Y.H., Wang, L.H., and Zhang, L.H. (2007) Quorum-quenching microbial infections: Mechanisms and implications. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* **362**: 1201–1211.

Drescher, K., Shen, Y., Bassler, B.L., and Stone, H.A. (2013) Biofilm streamers cause catastrophic disruption of flow with consequences for environmental and medical systems. *Proc Natl Acad Sci* **110**: 4345–4350.

Duetz, W.A., Rüedi, L., Hermann, R., O’Connor, K., Büchs, J., and Witholt, B. (2000) Methods for Intense Aeration , Growth , Storage , and Replication of Bacterial Strains in

- Microtiter Plates. *Appl Environ Microbiol* **66**: 2641–2646.
- Eaton, R.W., and Ribbons, D.W. (1982) Metabolism of Dibutylphthalate and Phthalate by *Micrococcus* sp. Strain 12B. *J Bacteriol* **151**: 48–57.
- Edberg, S.C., Rice, E.W., Karlin, R.J., and Allen, M.J. (2000) *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. *J Appl Microbiol* **88**: 106S–116S.
- Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., and Kjelleberg, S. (2016) Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* **14**: 563–575.
- Flemming, H.C., Neu, T.R., and Wozniak, D.J. (2007) The EPS matrix: The “House of Biofilm Cells.” *J Bacteriol* **189**: 7945–7947.
- Flemming, H.C., and Wingender, J. (2010) The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* **8**: 623–633.
- Förster, A.H., Beblawy, S., Golitsch, F., and Gescher, J. (2017) Electrode-assisted acetoin production in a metabolically engineered *Escherichia coli* strain. *Biotechnol Biofuels* **10**: 1–11.
- Freeman, C., and Lock, M.A. (1995) The biofilm polysaccharide matrix: A buffer against changing organic substrate supply? *Limnol Oceanogr* **40**: 273–278.
- Fuller, C.W., Middendorf, L.R., Benner, S.A., Church, G.M., Harris, T., Huang, X., *et al.* (2009) The challenges of sequencing by synthesis. *Nat Biotechnol* **27**: 1013–1023.
- Fux, C.A., Costerton, J.W., Stewart, P.S., and Stoodley, P. (2005) Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol* **13**: 34–40.
- Goeres, D.M., Hamilton, M.A., Beck, N.A., Buckingham-Meyer, K., Hilyard, J.D., Loetterle, L.R., *et al.* (2009) A method for growing a biofilm under low shear at the air-liquid interface using the drip flow biofilm reactor. *Nat Protoc* **4**: 783–788.
- Golitsch, F., Bücking, C., and Gescher, J. (2013) Proof of principle for an engineered microbial biosensor based on *Shewanella oneidensis* outer membrane protein complexes. *Biosens Bioelectron* **47**: 285–291.
- Gomes, I.B., Lemos, M., Mathieu, L., Simões, M., and Simões, L.C. (2018) The action of chemical and mechanical stresses on single and dual species biofilm removal of drinking water bacteria. *Sci Total Environ* **631–632**: 987–993.

- González-Rivas, F., Ripolles-Avila, C., Fontecha-Umaña, F., Ríos-Castillo, A.G., and Rodríguez-Jerez, J.J. (2018) Biofilms in the Spotlight: Detection, Quantification, and Removal Methods. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **17**: 1261–1276.
- Greenblatt, C.L., Baum, J., Klein, B.Y., Nachshon, S., Koltunov, V., and Cano, R.J. (2004) *Micrococcus luteus* - Survival in Amber. *Microb Ecol* **48**: 120–127.
- Grießmeier, V., Bremges, A., McHardy, A.C., and Gescher, J. (2017) Investigation of different nitrogen reduction routes and their key microbial players in wood chip-driven denitrification beds. *Sci Rep* **7**: 1–12.
- Griffin, A.S., West, S.A., and Buckling, A. (2004) Cooperation and competition in pathogenic bacteria. *Nature* **430**: 1024–1027.
- Guerrero-Beltrán, J.A., and Barbosa-Cánovas, G. V. (2004) Review: Advantages and limitations on processing foods by UV light. *Food Sci Technol Int* **10**: 137–147.
- Haagensen, J.A.J., Klausen, M., Ernst, R.K., Miller, S.I., Folkesson, A., Tolker-Nielsen, T., and Molin, S. (2007) Differentiation and Distribution of Colistin- and Sodium Dodecyl Sulfate-Tolerant Cells in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *J Bacteriol* **189**: 28–37.
- Halan, B., Buehler, K., and Schmid, A. (2012) Biofilms as living catalysts in continuous chemical syntheses. *Trends Biotechnol* **30**: 453–465.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., and Stoodley, P. (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* **2**: 95–108.
- Hammer, B.K., and Bassler, B.L. (2003) Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* **50**: 101–114.
- Hansen, S.H., Kabbeck, T., Radtke, C.P., Krause, S., Krolitzki, E., Peschke, T., *et al.* (2017) Machine-assisted cultivation and analysis of biofilms. *bioRxiv* 210583.
- Hansen, S.K., Rainey, P.B., Haagensen, J.A.J., and Molin, S. (2007) Evolution of species interactions in a biofilm community. *Nature* **445**: 533–536.
- Hausner, M., and Wuertz, S. (1999) High Rates of Conjugation in Bacterial Biofilms as Determined by Quantitative In Situ Analysis. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3710–3713.
- Henson, J.M., and Walker, J.R. (1982) Genetic Analysis of *acrA* and *lir* Mutations of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **152**: 1301–1302.

- Hibbing, M.E., Fuqua, C., Parsek, M.R., and Peterson, S.B. (2010) Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat Rev Microbiol* **8**: 15–25.
- Holmes, A.L., Wise, S.S., and Wise, J.P. (2008) Carcinogenicity of hexavalent chromium. *Indian J Med Res* **128**: 353–372.
- Hunt, S.M., Werner, E.M., Huang, B., Hamilton, M.A., and Stewart, P.S. (2004) Hypothesis for the Role of Nutrient Starvation in Biofilm Detachment. *Appl Environ Microbiol* **70**: 7418–7425.
- Hunter, P. (2008) The paradox of model organisms. *Sci Soc* **9**: 717–720.
- Ivanova, E.P., Christen, R., Bizet, C., Clermont, D., Motreff, L., Bouchier, C., *et al.* (2009) *Pseudomonas brassicacearum* subsp. *neoaurantiaca* subsp. nov., orange-pigmented bacteria isolated from soil and the rhizosphere of agricultural plants. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**: 2476–2481.
- Jain, A., and Bhosle, N.B. (2009) Biochemical composition of the marine conditioning film: implications for bacterial adhesion. *Biofouling* **25**: 13–19.
- Kabbeck, T. (2015) Etablierung einer Mikrofluidikplattform zur Kokultivierung und Anreicherung von Mikroorganismen. (Masterthesis)
- Kalia, V.C. (2013) Quorum sensing inhibitors: An overview. *Biotechnol Adv* **31**: 224–245.
- Karatan, E., and Watnick, P. (2009) Signals, Regulatory Networks, and Materials That Build and Break Bacterial Biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**: 310–347.
- Kempf, V.A.J., Trebesius, K., and Autenrieth, I.B. (2000) Fluorescent in situ hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures. *J Clin Microbiol* **38**: 830–838.
- Kim, H.N., Yun, Y., Ryu, S., Chang, Y., Kwon, M.J., Cho, J., *et al.* (2018) Correlation between gut microbiota and personality in adults: A cross-sectional study. *Brain Behav Immun* **69**: 374–385.
- Kim, J., Hegde, M., Kim, S.H., Wood, T.K., and Jayaraman, A. (2012) A microfluidic device for high throughput bacterial biofilm studies. *Lab Chip* **12**: 1157–1163.
- Kirisits, M.J., Prost, L., Starkey, M., and Parsek, M.R. (2005) Characterization of Colony Morphology Variants Isolated from *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm. *Appl Environ Microbiol* **71**: 4809–4821.

Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S., and Tolker-Nielsen, T. (2003) Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol* **48**: 1511–1524.

Kloos, W.E., and Musselwhite, M.S. (1975) Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. *Appl Microbiol* **30**: 381–385.

Kocur, M., Pacova, Z., and Martinec, T. (1972) Taxonomic Status of *Micrococcus luteus* (Schroeter 1872) Cohn 1872, and Designation of the Neotype Strain. *IntJSystBacteriol* **22**: 218–223.

Kornegay, B.H., and Andrews, J.F. (1968) Kinetics of Fixed-Film Biological Reactors. *J Water Pollut Control Fed* **40**: R460–R468.

Koza, A., Moshynets, O., Otten, W., and Spiers, A.J. (2011) Environmental modification and niche construction: developing O<sub>2</sub> gradients drive the evolution of the Wrinkly Spreader. *ISME J* **5**: 665–673.

Kozich, J.J., Westcott, S.L., Baxter, N.T., Highlander, S.K., and Schloss, P.D. (2013) Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the miseq illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol* **79**: 5112–5120.

Labas, M.D., Martín, C.A., and Cassano, A.E. (2005) Kinetics of bacteria disinfection with UV radiation in an absorbing and nutritious medium. *Chem Eng J* **114**: 87–97.

Lazarova, V., and Manem, J. (1995) Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. *Water Res* **29**: 2227–2245.

Lewis, K. (2007) Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat Rev Microbiol* **5**: 48–56.

Liu, J., Prindle, A., Humphries, J., Gabalda-sagarra, M., Asally, M., and Lee, D.D. (2015) Metabolic co-dependence gives rise to collective oscillations within biofilms. *Nature* **523**: 550–554.

Liu, W., Russel, J., Røder, H.L., Madsen, J.S., Burmølle, M., and Sørensen, S.J. (2017) Low-abundant species facilitates specific spatial organization that promotes multispecies biofilm formation. *Environ Microbiol* **19**: 2893–2905.

- Loeb, G.I., and Neihof, R.A. (1975) Marine Conditioning Films. In *Applied Chemistry at Protein Interfaces*. AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, pp. 319–335.
- Logan, B.E. (2009) Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. *Nat Rev Microbiol* **7**: 375–381.
- Logan, B.E., and Regan, J.M. (2006) Microbial Fuel Cells—Challenges and Applications. *Environ Sci Technol* **40**: 5172–5180.
- Ma, D., Alberti, M., Lynch, C., Nikaido, H., and Hearst, J.E. (1996) The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of *acrAB* genes of *Escherichia coli* by global stress signals. *Mol Microbiol* **19**: 101–112.
- MacIntyre, D.L., Miyata, S.T., Kitaoka, M., and Pukatzki, S. (2010) The *Vibrio cholerae* type VI secretion system displays antimicrobial properties. *Proc Natl Acad Sci* **107**: 19520–19524.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., and Schleifer, K.H. (1992) Phylogenetic Oligodeoxynucleotide Probes for the Major Subclasses of Proteobacteria: Problems and Solutions. *Syst Appl Microbiol* **15**: 593–600.
- Martin, M., Hölscher, T., Dragoš, A., Cooper, V.S., and Kovács, Á.T. (2016) Laboratory Evolution of Microbial Interactions in Bacterial Biofilms. *J Bacteriol* **198**: 2564–2571.
- Martinez, J.L., Sánchez, M.B., Martínez-Solano, L., Hernandez, A., Garmendia, L., Fajardo, A., and Alvarez-Ortega, C. (2009) Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* **33**: 430–449.
- Mas, A., Jamshidi, S., Lagadeuc, Y., Eveillard, D., and Vandenkoornhuyse, P. (2016) Beyond the Black Queen Hypothesis. *ISME J* **10**: 2085–2091.
- Matz, C., and Kjelleberg, S. (2005) Off the hook – how bacteria survive protozoan grazing. *Trends Microbiol* **13**: 302–307.
- McCarty, N.S., and Ledesma-Amaro, R. (2019) Synthetic Biology Tools to Engineer Microbial Communities for Biotechnology. *Trends Biotechnol* **37**: 181–197.
- McCoy, W.F., Bryers, J.D., Robbins, J., and Costerton, J.W. (1981) Observations of fouling biofilm formation. *Can J Microbiol* **27**: 910–917.
- McDonald, J.C., and Whitesides, G.M. (2002) Poly(dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices. *Acc Chem Res* **35**: 491–499.

- Meckenstock, R.U., Elsner, M., Griebler, C., Lueders, T., Stumpp, C., Aamand, J., *et al.* (2015) Biodegradation: Updating the Concepts of Control for Microbial Cleanup in Contaminated Aquifers. *Environ Sci Technol* **49**: 7073–7081.
- Mika, F., and Hengge, R. (2013) Small regulatory RNAs in the control of motility and biofilm formation in *E. coli* and *Salmonella*. *Int J Mol Sci* **14**: 4560–4579.
- Min, B., Cheng, S., and Logan, B.E. (2005) Electricity generation using membrane and salt bridge microbial fuel cells. *Water Res* **39**: 1675–1686.
- Molin, S., and Tolker-Nielsen, T. (2003) Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Curr Opin Biotechnol* **14**: 255–261.
- Morgan-Sagastume, F., Larsen, P., Nielsen, J.L., and Nielsen, P.H. (2008) Characterization of the loosely attached fraction of activated sludge bacteria. *Water Res* **42**: 843–854.
- Morris, J.J. (2015) Black Queen evolution: The role of leakiness in structuring microbial communities. *Trends Genet* **31**: 475–482.
- Morris, J.J., Johnson, Z.I., Szul, M.J., Keller, M., and Zinser, E.R. (2011) Dependence of the cyanobacterium *Prochlorococcus* on hydrogen peroxide scavenging microbes for growth at the ocean's surface. *PLoS One* **6**.
- Morris, J.J., Lenski, R.E., and Zinser, E.R. (2012) The Black Queen Hypothesis : Evolution of Dependencies through. *MBio* **3**: 1–7.
- Mukamolova, G. V., Turapov, O.A., Kazarian, K., Telkov, M., Kaprelyants, A.S., Kell, D.B., and Young, M. (2002) The *rpf* gene of *Micrococcus luteus* encodes an essential secreted growth factor. *Mol Microbiol* **46**: 611–621.
- Nadell, C.D., Drescher, K., and Foster, K.R. (2016) Spatial structure, cooperation and competition in biofilms. *Nat Rev Microbiol* **14**: 589–600.
- O'Toole, G.A., and Kolter, R. (1998a) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* **28**: 449–461.
- O'Toole, G.A., and Kolter, R. (1998b) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* **30**: 295–304.
- Olsen, I. (2015) Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *Eur J Clin Microbiol*

*Infect Dis* **34**: 877–886.

Peck, O.P.W., Chew, Y.M.J., and Bird, M.R. (2018) On-line quantification of thickness and strength of single and mixed species biofilm grown under controlled laminar flow conditions. *Food Bioprod Process* **113**: 49–59.

Potts, M. (1994) Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol Rev* **58**: 755–805.

Ramírez-Díaz, M.I., Díaz-Pérez, C., Vargas, E., Riveros-Rosas, H., Campos-García, J., and Cervantes, C. (2008) Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *Biometals* **21**: 321–332.

Ramsing, N.B., Kühl, M., and Jorgensen, B.B. (1993) Distribution of Sulfate-Reducing Bacteria, O<sub>2</sub>, and H<sub>2</sub>S in Photosynthetic Biofilms Determined by Oligonucleotide Probes and Microelectrodes. *Appl Environ Microbiol* **59**: 3840–3849.

Rani, S.A., Pitts, B., Beyenal, H., Veluchamy, R.A., Lewandowski, Z., Davison, W.M., *et al.* (2007) Spatial Patterns of DNA Replication, Protein Synthesis, and Oxygen Concentration within Bacterial Biofilms Reveal Diverse Physiological States. *J Bacteriol* **189**: 4223–4233.

Rasmussen, M., Abdellaoui, S., and Minteer, S.D. (2016) Enzymatic biofuel cells: 30 years of critical advancements. *Biosens Bioelectron* **76**: 91–102.

Redondo-Nieto, M., Barret, M., Morrissey, J.P., Germaine, K., Martínez-Granero, F., Barahona, E., *et al.* (2012) Genome Sequence of the Biocontrol Strain *Pseudomonas fluorescens* F113. *J Bacteriol* **194**: 1273–1274.

Ren, D., Madsen, J.S., Sørensen, S.J., and Burmølle, M. (2015) High prevalence of biofilm synergy among bacterial soil isolates in cocultures indicates bacterial interspecific cooperation. *ISME J* **9**: 81–89.

Rendueles, O., and Ghigo, J.-M. (2015) Mechanisms of Competition in Biofilm Communities. *Microbiol Spectr* **3**: 1–18.

Roberson, E.B., and Firestone, M.K. (1992) Relationship between Desiccation and Exopolysaccharide Production in a Soil *Pseudomonas* sp. *Appl Environ Microbiol* **58**: 1284–1291.

Røder, H.L., Sørensen, S.J., and Burmølle, M. (2016) Studying Bacterial Multispecies Biofilms: Where to Start? *Trends Microbiol* **24**: 503–513.

Roller, C., Wagner, M., Amann, R., and Ludwig, W. (1994) In situ probing of Gram-positive

- bacteria with high DNA G+C content using 23s rRNA- targeted oligonucleotides. *Microbiology* **140**: 2849–2858.
- Roller, S.D., Bennetto, H.P., Delaney, G.M., Mason, J.R., Stirling, J.L., and Thurston, C.F. (1984) Electron-transfer coupling in microbial fuel cells: 1. comparison of redox-mediator reduction rates and respiratory rates of bacteria. *J Chem Technol Biotechnol* **34**: 3–12.
- Sauer, K., Camper, A.K., Ehrlich, G.D., Costerton, J.W., and Davies, D.G. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm. *J Bacteriol* **184**: 1140–1154.
- Scales, B.S., Dickson, R.P., LiPuma, J.J., and Huffnagle, G.B. (2014) Microbiology, Genomics, and Clinical Significance of the *Pseudomonas fluorescens* Species Complex, an Unappreciated Colonizer of Humans. *Clin Microbiol Rev* **27**: 927–948.
- Schieß, S. (2017) Etablierung der in situ UV-Mutagenese in einem neuartigen mikrofluidischen Kultivierungssystem. (Masterthesis)
- Schlafer, S., Baelum, V., and Dige, I. (2018) Improved pH-ratiometry for the three-dimensional mapping of pH microenvironments in biofilms under flow conditions. *J Microbiol Methods* **152**: 194–200.
- Schramm, A., Larsen, L.H., Revsbech, N.P., Ramsing, N.B., Amann, R., and Schleifer, K.H. (1996) Structure and Function of a Nitrifying Biofilm as Determined by In Situ Hybridization and the Use of Microelectrodes. *Appl Environ Microbiol* **62**: 4641–4647.
- Serra, D.O., Richter, A.M., and Hengge, R. (2013) Cellulose as an Architectural Element in Spatially Structured *Escherichia coli* Biofilms. *J Bacteriol* **195**: 5540–5554.
- Sharma, P.K., Gibcus, M.J., Mei, H.C. Van Der, and Busscher, H.J. (2005) Influence of Fluid Shear and Microbubbles on Bacterial Detachment from a Surface. *Appl Environ Microbiol* **71**: 3668–3673.
- Sheng, G.P., Yu, H.Q., and Li, X.Y. (2010) Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review. *Biotechnol Adv* **28**: 882–894.
- Simões, M., Pereira, M.O., and Vieira, M.J. (2005) Effect of mechanical stress on biofilms challenged by different chemicals. *Water Res* **39**: 5142–5152.
- Simões, M., Simões, L.C., and Vieira, M.J. (2010) A review of current and emergent biofilm

control strategies. *LWT - Food Sci Technol* **43**: 573–583.

Skolimowski, M., Nielsen, M.W., Emnéus, J., Molin, S., Taboryski, R., Sternberg, C., *et al.* (2010) Microfluidic dissolved oxygen gradient generator biochip as a useful tool in bacterial biofilm studies. *Lab Chip* **10**: 2162–2169.

Small, P., Blankenhorn, D., Welty, D., Zinser, E., and Slonczewski, J.L. (1994) Acid and Base Resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri* : Role of rpoS and Growth pH. *J Bacteriol* **176**: 1729–1737.

Song, J.L., Au, K.H., Huynh, K.T., and Packman, A.I. (2014) Biofilm responses to smooth flow fields and chemical gradients in novel microfluidic flow cells. *Biotechnol Bioeng* **111**: 597–607.

Spiers, A.J., Bohannon, J., Gehrig, S.M., and Rainey, P.B. (2003) Biofilm formation at the air-liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. *Mol Microbiol* **50**: 15–27.

Stewart, E.J. (2012) Growing unculturable bacteria. *J Bacteriol* **194**: 4151–4160.

Stewart, P.S., and Costerton, J.W. (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* **358**: 135–138.

Stewart, P.S., and Franklin, M.J. (2008) Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol* **6**: 199–210.

Stinnesbeck, W., Frey, E., Zell, P., Avilés, J., Hering, F., Frank, N., *et al.* (2018) Hells Bells – unique speleothems from the Yucatán Peninsula, Mexico, generated under highly specific subaquatic conditions. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* **489**: 209–229.

Stoodley, P., Cargo, R., Rupp, C.J., Wilson, S., and Klapper, I. (2002) Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *J Ind Microbiol Biotechnol* **29**: 361–367.

Stoodley, P., Wilson, S., Hall-stoodley, L., Boyle, J.D., Lappin-scott, H.M., and Costerton, J.W. (2001) Growth and Detachment of Cell Clusters from Mature Mixed-Species Biofilms. *Appl Environ Microbiol* **67**: 5608–5613.

Sturm-Richter, K., Golitsch, F., Sturm, G., Kipf, E., Dittrich, A., Beblawy, S., *et al.* (2015) Unbalanced fermentation of glycerol in *Escherichia coli* via heterologous production of an electron transport chain and electrode interaction in microbial electrochemical cells.

*Bioresour Technol* **186**: 89–96

Sturm, G., Brunner, S., Suvorova, E., Dempwolff, F., Reiner, J., Graumann, P., *et al.* (2018) Chromate Resistance Mechanisms in *Leucobacter chromiiresistens*. *Appl Environ Microbiol* **84**: 1–11.

Sturm, G., Jacobs, J., Spröer, C., Schumann, P., and Gescher, J. (2011) *Leucobacter chromiiresistens* sp. nov., a chromate-resistant strain. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**: 956–960.

Sturm, G., Richter, K., Doetsch, A., Heide, H., Louro, R.O., and Gescher, J. (2015) A dynamic periplasmic electron transfer network enables respiratory flexibility beyond a thermodynamic regulatory regime. *ISME J* **9**: 1802–1811.

Subramanya, H.S., Arciszewska, L.K., Baker, R.A., Bird, L.E., Sherratt, D.J., and Wigley, D.B. (1997) Crystal structure of the site-specific recombinase, XerD. *EMBO J* **16**: 5178–5187.

Sugino, Y. (1966) Mutants of *Escherichia coli* sensitive to methylene blue and acridines. *Genet Res* **7**: 1–11.

Sund, C.J., McMasters, S., Crittenden, S.R., Harrell, L.E., and Sumner, J.J. (2007) Effect of electron mediators on current generation and fermentation in a microbial fuel cell. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**: 561–568.

Thomson, N.R., Crow, M.A., McGowan, S.J., Cox, A., and Salmond, G.P.C. (2000) Biosynthesis of carbapenem antibiotic and prodigiosin pigment in *Serratia* is under quorum sensing control. *Mol Microbiol* **36**: 539–556.

Tielen, P., Kuhn, H., Rosenau, F., Jaeger, K.E., Flemming, H.-C., and Wingender, J. (2013) Interaction between extracellular lipase LipA and the polysaccharide alginate of *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol* **13**: 159.

Tuite, E.M., and Kelly, J.M. (1993) Photochemical interactions of methylene blue and analogues with DNA and other biological substrates. *J Photochem Photobiol B Biol* **21**: 103–124.

Uden, G., and Bongaerts, J. (1997) Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochim Biophys Acta* **1320**: 217–234.

Usacheva, M.N., Teichert, M.C., and Biel, M.A. (2001) Comparison of the methylene blue

- and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med* **29**: 165–173.
- Vaysse, P.-J., Sivadon, P., Goulas, P., and Grimaud, R. (2011) Cells dispersed from *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 biofilm exhibit a specific protein profile associated with a higher ability to reinitiate biofilm development at the hexadecane–water interface. *Environ Microbiol* **13**: 737–746.
- Vert, M., Doi, Y., Hellwich, K.-H., Hess, M., Hodge, P., Kubisa, P., *et al.* (2012) Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure Appl Chem* **84**: 377–408.
- Visca, P., Imperi, F., and Lamont, I.L. (2007) Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends Microbiol* **15**: 22–30.
- Visick, K.L., Foster, J., Doino, J., McFall-Ngai, M., and Ruby, E.G. (2000) *Vibrio fischeri* lux genes play an important role in colonization and development of the host light organ. *J Bacteriol* **182**: 4578–4586.
- Walsh, C. (2000) Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* **406**: 775–781.
- Wang, B.L., Ghaderi, A., Zhou, H., Agresti, J., Weitz, D.A., Fink, G.R., and Stephanopoulos, G. (2014) Microfluidic high-throughput culturing of single cells for selection based on extracellular metabolite production or consumption. *Nat Biotech* **32**: 473–478.
- Waters, C.M., and Bassler, B.L. (2005) Quorum Sensing : Communication in Bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 319–346.
- Wei, J., Liang, P., and Huang, X. (2011) Recent progress in electrodes for microbial fuel cells. *Bioresour Technol* **102**: 9335–9344.
- Weibel, D.B., and Whitesides, G.M. (2006) Applications of microfluidics in chemical biology. *Curr Opin Chem Biol* **10**: 584–591.
- Wieser, M., Denner, E.B.M., Kämpfer, P., Schumann, P., Tindall, B., Steiner, U., *et al.* (2002) Emended descriptions of the genus *Micrococcus*, *Micrococcus luteus* (Cohn 1872) and *Micrococcus lylae* (Kloos *et al.* 1974). *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 629–637.
- Wilking, J.N., Zaburdaev, V., Volder, M. De, Losick, R., Brenner, M.P., and Weitz, D.A. (2013) Liquid transport facilitated by channels in *Bacillus subtilis* biofilms. *Proc Natl Acad*

*Sci* **110**: 848–852.

Williams, P. (2007) Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology* **153**: 3923–3938.

Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F.O., Ludwig, W., Schleifer, K.H., *et al.* (2014) Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nat Rev Microbiol* **12**: 635–645.

Young, M., Artsatbanov, V., Beller, H.R., Chandra, G., Chater, K.F., Dover, L.G., *et al.* (2010) Genome Sequence of the Fleming Strain of *Micrococcus luteus*, a Simple Free-Living Actinobacterium. *J Bacteriol* **192**: 841–860.

Zelezniak, A., Andrejev, S., Ponomarova, O., Mende, D.R., Bork, P., and Patil, K.R. (2015) Metabolic dependencies drive species co-occurrence in diverse microbial communities. *Proc Natl Acad Sci* **112**: 6449–6454.

Zhang, H., Pereira, B., Li, Z., and Stephanopoulos, G. (2015) Engineering *Escherichia coli* coculture systems for the production of biochemical products. *Proc Natl Acad Sci* **112**: 8266–8271.

Zhang, T.C., Fu, Y.-C., and Bishop, P.L. (1995) Competition and space for substrate in biofilms. *Water Environ Res* **67**: 992–1003.

Zhuang, W.-Q., Tay, J.-H., Maszenan, A.M., Krumholz, L.R., and Tay, S.T.-L. (2003) Importance of Gram-positive naphthalene-degrading bacteria in oil-contaminated tropical marine sediments. *Lett Appl Microbiol* **36**: 251–257.

Ziegler, S., Ackermann, S., Majzlan, J., and Gescher, J. (2009) Matrix composition and community structure analysis of a novel bacterial pyrite leaching community. *Environ Microbiol* **11**: 2329–2338.

Ziegler, S., Dolch, K., Geiger, K., Krause, S., Asskamp, M., Eusterhues, K., *et al.* (2013) Oxygen-dependent niche formation of a pyrite-dependent acidophilic consortium built by archaea and bacteria. *ISME J* **7**: 1725–1737

## 6. Anhang

### 6.1 Ergänzung Material und Methoden

Tab. 37: Positionierung und Volumina vorzubereitender Lösungen für die automatisierte FISH [ $\mu$ l].

<b>ST1 Storage (RT; Deepwell-Platte)</b>						
Arbeitsschritt	Permeab.	Waschen	Inhibierung	Waschen	DAPI	Einbettung
Reagenz	HCl (0,1 M)	SSC pH6	ddH <sub>2</sub> O	PBS 1x	ddH <sub>2</sub> O	Einbettpuffer
Position	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>
<b>A</b>	>370	>370	>208	>370	>370	>230
<b>C</b>	>370	>370	>208	>370	>370	>230
<b>E</b>	>370	>370	>208	>370	>370	>230

<b>cool Storage (Grid 5; 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße)</b>		
Arbeitsschritt	Hybridisierung	DAPI
Reagenz	HP +Sonde	DAPI
Position	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>A</b>	>370	>370
<b>B</b>	>370	>370
<b>C</b>	>370	>370

<b>warm Storage (thermocarrier Grid 42/pos 6; Deepwell-Platte)</b>	
Arbeitsschritt	Waschen
Reagenz	Waschpuffer
Position	<b>1</b>
<b>A</b>	>550
<b>C</b>	>550
<b>E</b>	>550

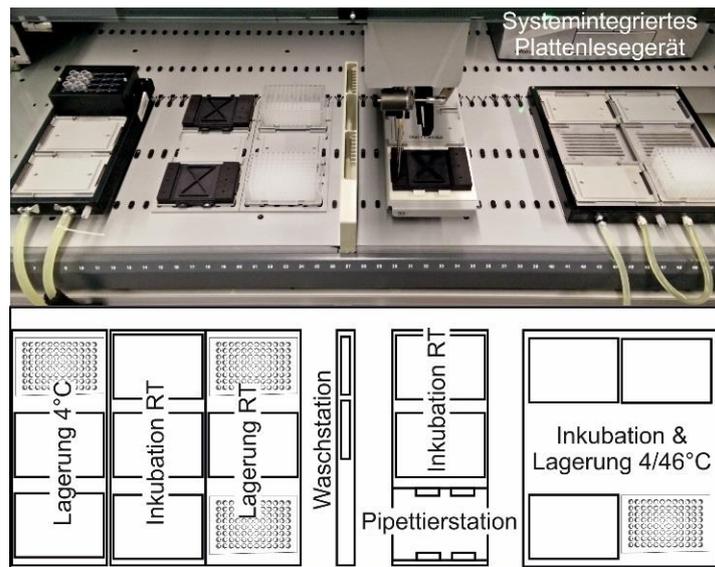


Abb. 37: Positionierungsschema verwendeter Module zur Durchführung automatisierter FISH (LHS: Freedom Evo, Tecan; Männedorf - Schweiz).

## 6.2 Ergänzende Ergebnisse

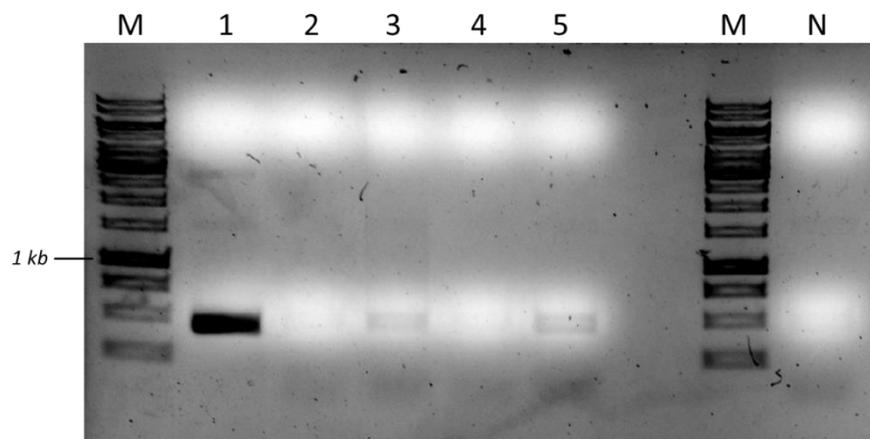


Abb. 38: Agarosegel der Test-PCR zur direkten Amplifizierung aus kleinen Probenvolumina mit Schwermetallanteil. M = 1kb-Marker; 1 = unverdünnte Probe aus dem vorderen Bereich („V“) eines mit 2 mM Chrom kultivierten Chips; 2 = 2 mM / V (1:100 verdünnt); 3 = 2 mM / „H“ (hinterer Bereich); 4 = 3 mM / V; 5 = 3 mM / H; N = Negativkontrolle.

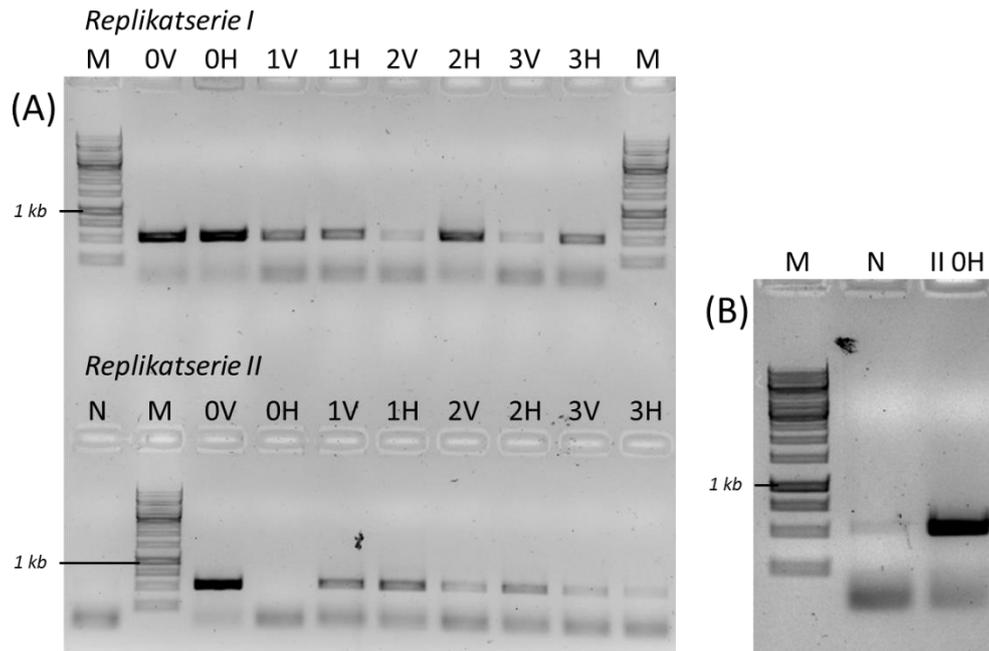


Abb. 39: Kontrollgel nach der Adapter-Amplifikation zur Vorbereitung von 16S-rDNA Amplicon Sequenzierungen. Durchgeführt mit Proben des Chrom-Experiment aus hinteren (H) sowie vorderen (V) Bereichen des Systems. 0 = aus Kultivierungen ohne Chrom(VI), 1 = mit 1 mM, 2 = mit 2 mM und 3 = mit 3 mM Chrom(VI) kultiviert.

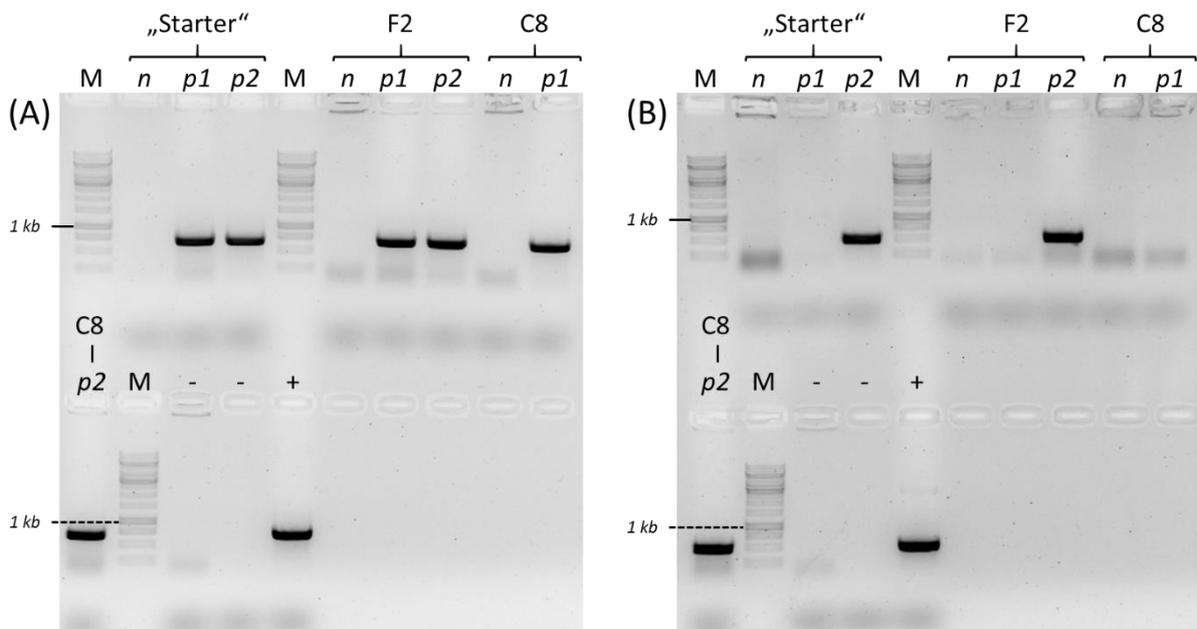


Abb. 40: Gelbilder zur Transformationskontrolle zum Ziel der Stammkomplementierung mit pEC86 und pBAD-STC. M = 1kb-Marker; n = native Variante vor der Transformation; p1 = mit pEC86; p2 = mit pEC86 & pBAD-STC; - = Negativkontrolle; + = Positivkontrolle (aufgereinigtes Plasmid).

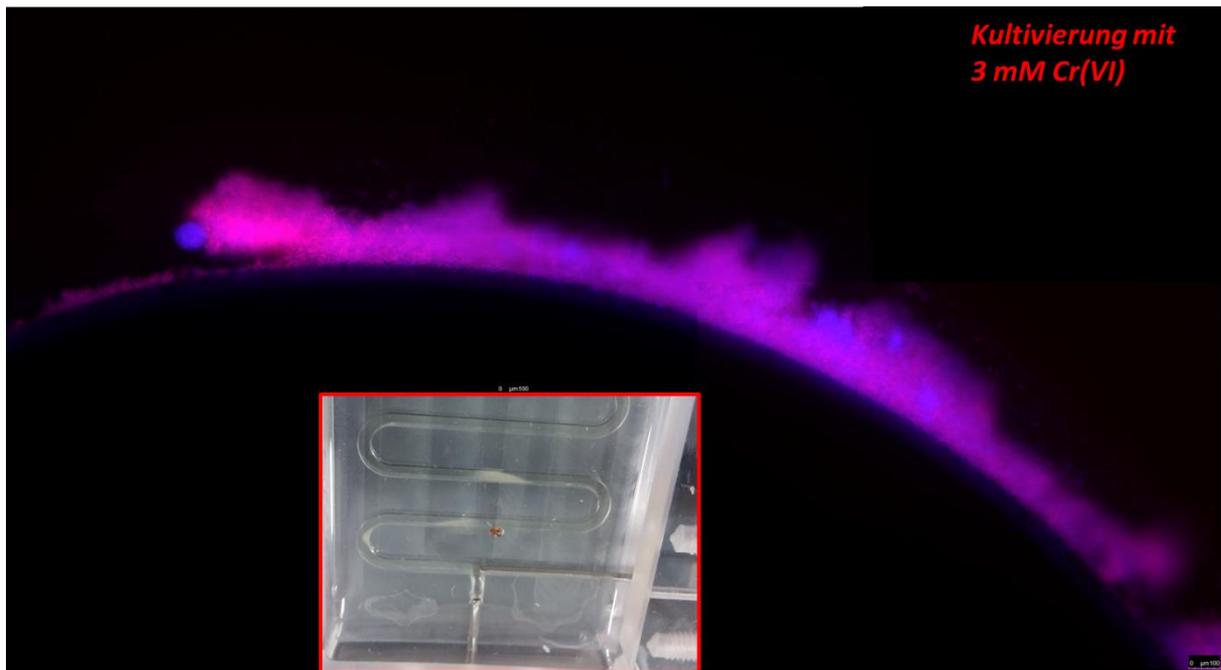


Abb. 41: Zusammengesetzte Aufnahme eines *L. chromiirestiens*-Streamer.

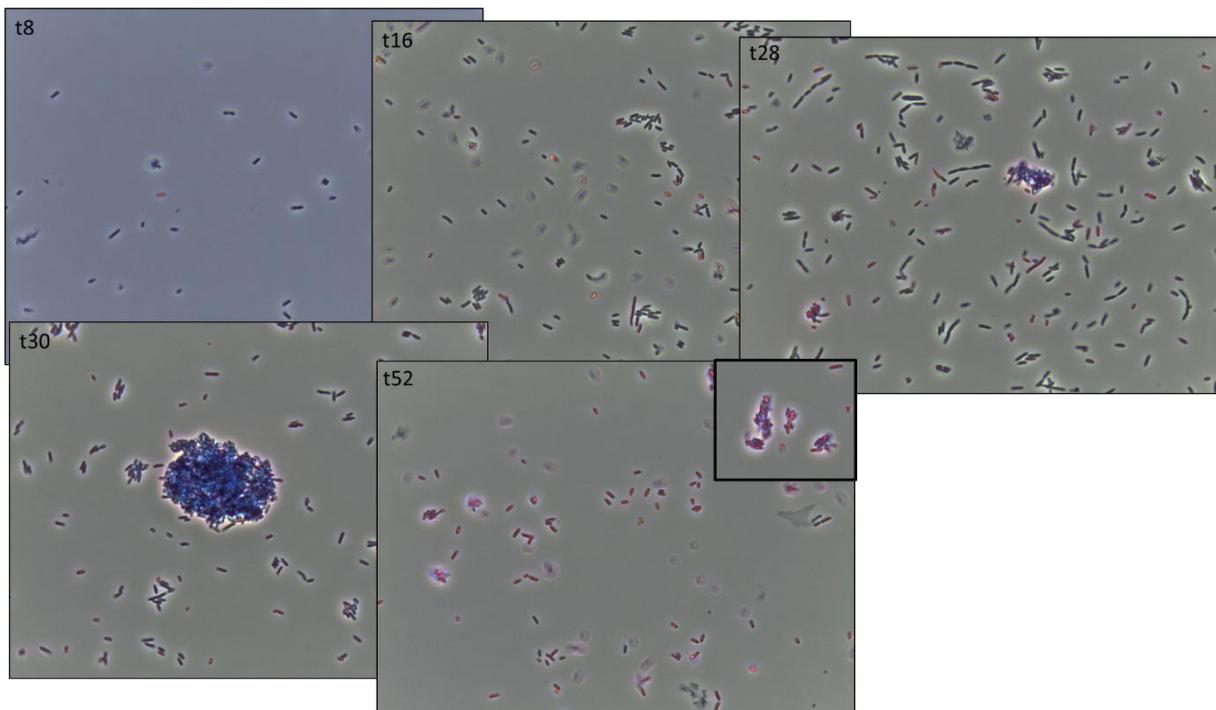
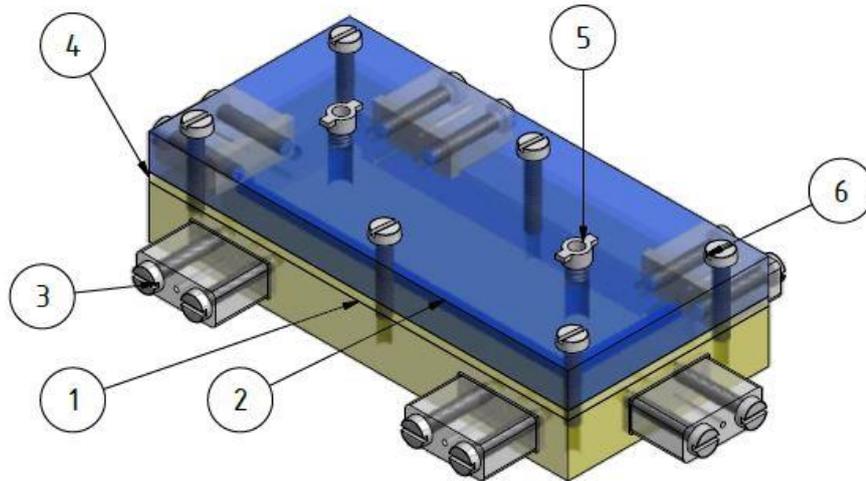
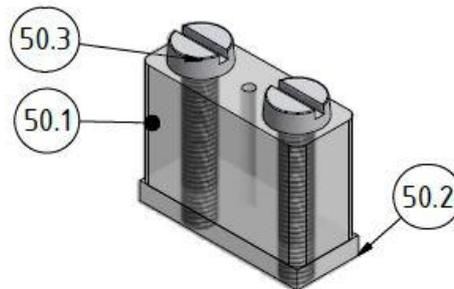


Abb. 42: Aufnahmen aus den Wachstumsversuchen mit der Stammvariante F2 und 1200 µM Methylenblau.

## 6.3 Technische Zeichnungen

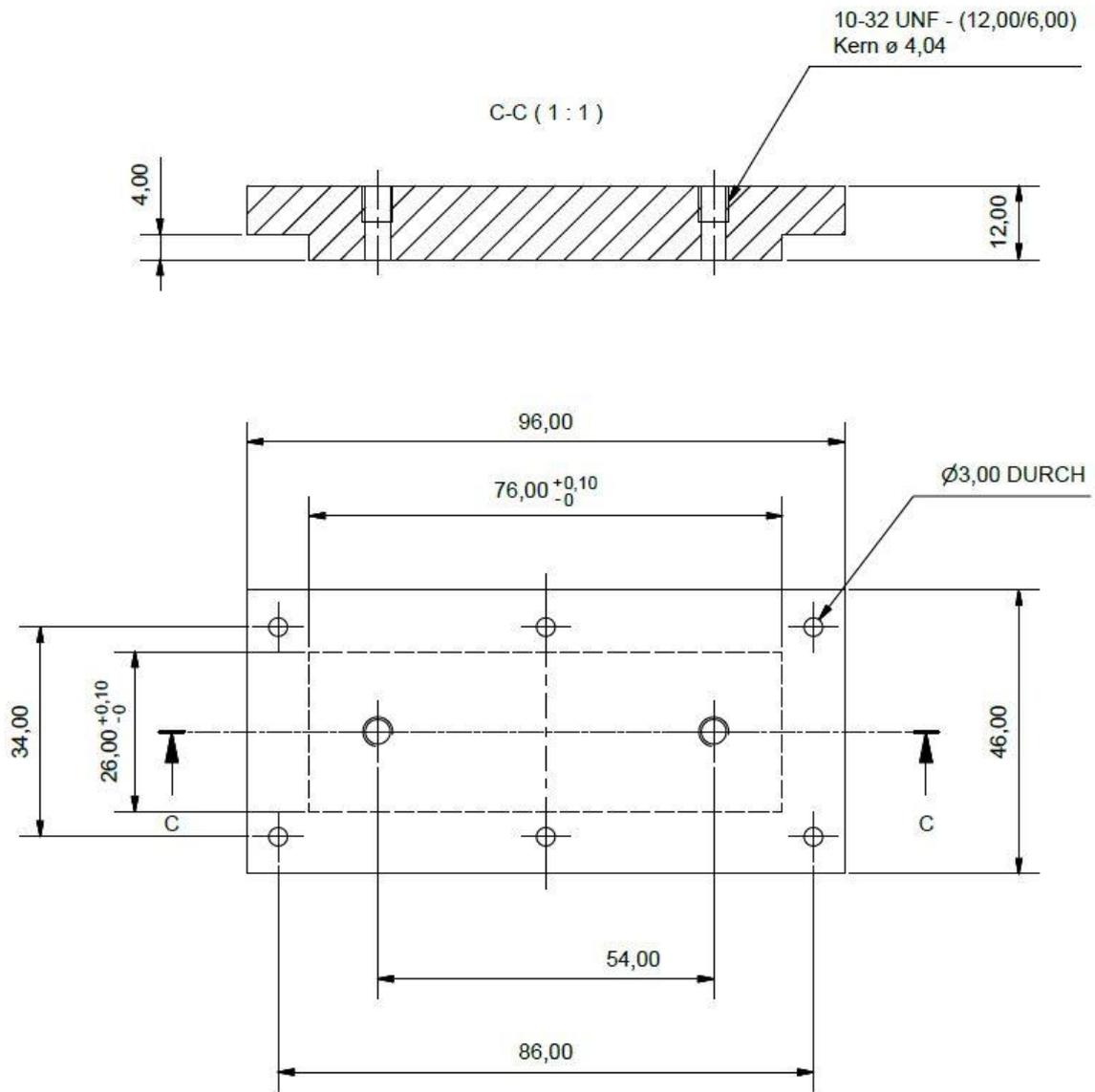


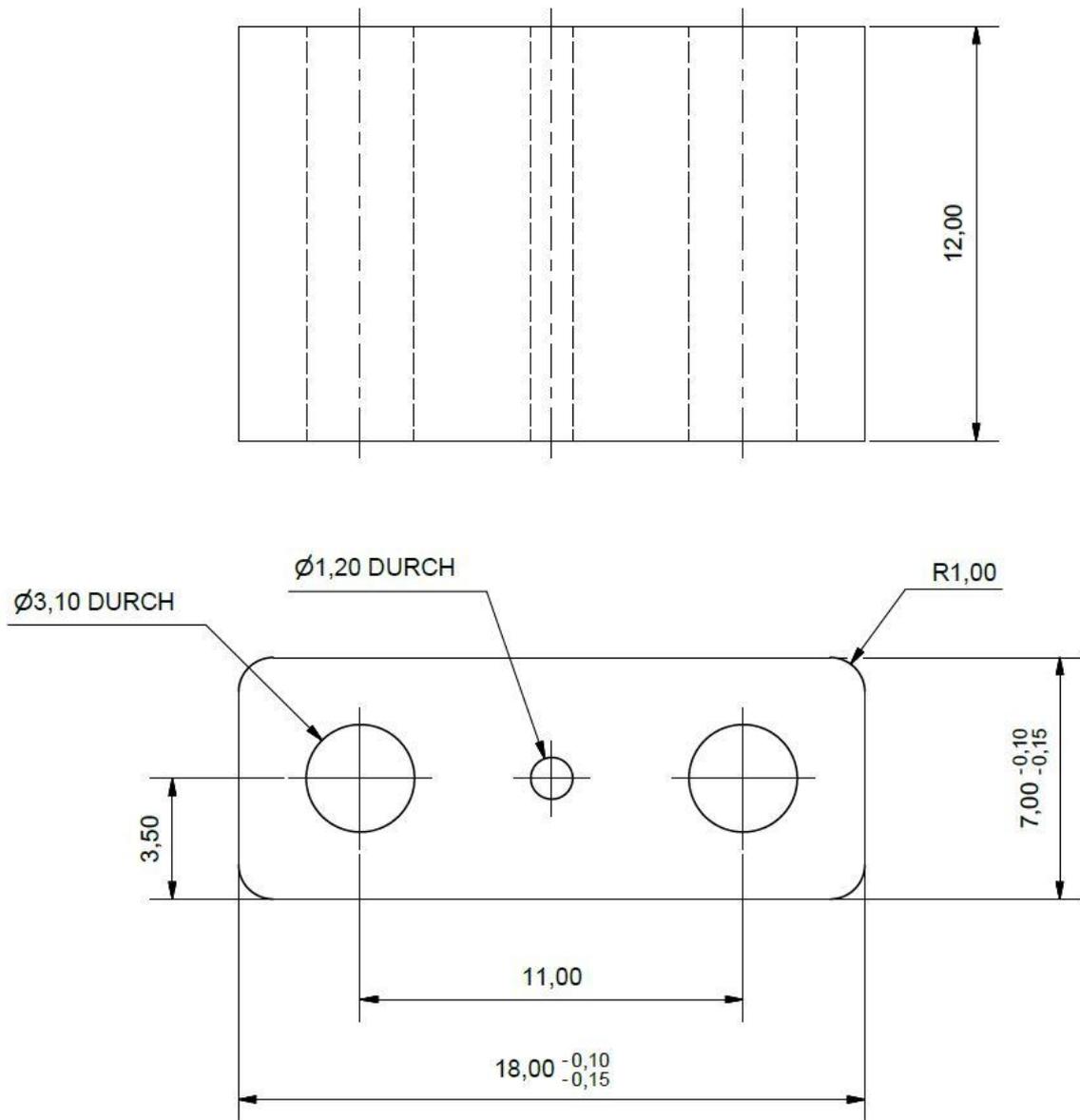
TEILELISTE				
OBJEKT	ANZAHL	BAUTEILNUMMER	MATERIAL	BESCHREIBUNG
1	50	Begasungsbox_Boden Brandsi modified A	Macrolon	
2	50	Begasungsbox_Deckel	Macrolon	
3	300	seitliche Dichtung montiert		
4	50	Dichtung Deckel	Dichtung	wird zugekauft
5	100	Luer Insert	Generisch	wird zugekauft
6	300	ISO 1207 - M3 x 16	Macrolon	Zylinderschraube mit Schlitz



TEILELISTE				
OBJEKT	ANZAHL	BAUTEILNUMMER	MATERIAL	BESCHREIBUNG
50.1	300	Verschlüsse	Macrolon	
50.2	300	Verschlussdichtung	Dichtung	wird zugekauft
50.3	100	ISO 1207 - M3 x 16	Kunststoff	Zylinderschraube mit Schlitz







## Danksagung

Als erstes möchte ich meinem Betreuer Johannes Gescher für die Möglichkeit dieser Arbeit danken. Aber noch viel mehr für... einfach alles! Danke, dass man auch spontan an deine Tür klopfen konnte, dass du doch immer irgendwie Zeit findest, dass du in Zeiten der Not hinter einem stehst, dass man sich (fachlich und auch im Alltag) auf dich verlassen kann und dass wir dir wichtig sind! Du hast ein großartiges Arbeitsumfeld geschaffen und auch für die kleinen persönlichen Momente, sei es die Weihnachtsfeier bei dir zuhause oder der Ausdauerlauf am Strand, möchte ich mich herzlich bei dir bedanken. Ich hatte eine gute Zeit und das lag nicht nur daran was ich tun konnte, sondern auch wie. Vielen Dank!

Ich möchte außerdem erneut Prof. Christof Niemeyer für die souveräne Schirmherrschaft über das Projekt danken. Darüber hinaus allerdings auch für die Einwilligung zum Korreferat, für das schnelle „Du“ zu Beginn der Promotion, für die lehrreichen Diskussionen nach Vorträgen und für Arnold.

Meiner Kooperationspartnerin Silla Hansen danke ich für die gute Zeit und die Mühe die du in das Projekt investiert hast. Danke für all die Hilfe die du geben konntest, den technischen Input in das System und allein für die Tatsache, dass man, wenn es mal nicht so gelaufen ist, nicht alleine war.

Dem MAB und allen voran Carsten Radtke möchte ich für die unglaubliche Hilfe bei der Nutzung von Roxanne danken. Carsten du hast es immer irgendwie möglich gemacht! Vielen Dank für die Geduld mit meinen Verspätungen, dass ich auch Studenten ohne Bedenken zu dir schicken konnte und für die Ruhe die du verbreitest. An dieser Stelle auch ein großes Dankeschön an den Rest des Teams und natürlich besonders an Prof. Jürgen Hubbuch, nicht nur für die Nutzung der LHS sondern auch für die netten Gespräche zwischendurch.

Ein riesiger Dank an die Kollegen aus dem Tiefgeschoss. Ohne euch wäre diese Arbeit eine andere geworden. Vielen, vielen Dank an Dieter und Torsten für eure Hilfsbereitschaft und den kreativen Input. Auch ein großes Dankeschön an Peter, Martin und alle anderen Minions. Ihr seid die Besten.

Ein besonderer Dank geht an meine AG-internen Kooperationspartner und ehemaligen Studenten. Vielen Dank an Susi, Tutut, Vicky, Jenny, Edina, Eva, Martin, Sebastian B., Sebastian S. und natürlich Janek. Besonders Janek möchte ich für die gute Zeit danken und wie

du dieses Projekt über deine Bachelorarbeit hinaus vorangebracht hast. Und dafür, dass aus dir mehr wurde als nur ein guter Student. An alle: Danke für das bunter werdende Projekt.

Der ganzen Arbeitsgruppe der AG Gescher möchte ich sagen: Vielen, vielen Dank für die tolle Zeit mit euch! Selbst in den schwierigsten und chaotischsten Phasen des Projekts war es nie ein Problem aufs Neue ins Labor zu kommen, da das von euch geschaffene Umfeld einfach umwerfend ist! Vielen Dank an: Tina, als treuen Mitstreiter seit dem ersten Semester; Steffi für deine Hilfsbereitschaft und den Brezel-Contest; Thea für deine Büro-übergreifende Versorgung mit Wort, Tat und Süßkram; France für Mon Cheri, Marzipan und über Süßkram hinaus; Ferdi und Daniel dafür dass ihr ein paar Y-Chromosomen ins Büro gebracht habt; Kadda für die besten Balkonabende überhaupt; Fredi für Enthusiasmus ohne Grenzen; Sebastian für deine Kompetenz und das Bier darüber hinaus; Tutut für deine freundliche Art und das Neue das ich lernen konnte; Sabrina für das richtige Projekt; Jonas für Kino und IT; Nicola für deine ständige Hilfe, Einsatzbereitschaft und den Cider; Miri und Laura – einer muss ja den Bierwart machen; Tobi für den coolen Namen und dass ich der „Alte“ sein konnte; Carina für all die Mittagessen und darüber hinaus; Simon für deine ruhige und witzige Art; Ebi für deine nicht so ruhige aber witzige Art; Lucas für Macaron und die Fachsimpelei; Anne für den gemeinsamen Kampf bis zum Schluss; Vero für deine Hilfsbereitschaft; Vicky für Leipzig und mehr; Kerstin und Edina – ihr macht das schon! Besonders Edina wünsche ich alles gute als neuem Chipexperten der AG Gescher. Auch unseren Postdoc danke ich für die tolle Zeit und die Souveränität die ihr mit ins Team bringt. Vielen Dank an: Mimi und Gunnar – immer eine Freude euch auf dem Markt über den Weg zu laufen; Sibylle für das Team und mehr; David für Qualityland und *för att vara en cool kille!* und Susi - für noch viel mehr.

Der AG Niemeyer danke ich für die allzeit offenen Arme, mit besonderem Dank an Tim, Kersten, Minja, Theo, Manni, Ruben und Arnold.

Jolanda, Sybille und Esther - danke, dass ihr alles am laufen haltet.

An Freunde und Familie sage ich: Ohne euch hätte ich das nicht geschafft! Danke für die kleinen und großen Pausen, Carepakete, Kinobesuche, Waldarbeiten, Biere, gemütliche und ungemütliche Abende, Marktbesuche, die Erfindung des Breakflix, dafür, dass ihr da wart und seid und für eure Geduld, wenn ich mal keine Zeit hatte.

Meinen Eltern möchte ich dafür danken, dass ich mich immer auf ihre Unterstützung verlassen kann. Ich sage euch das viel zu selten aber ich bin euch zutiefst dankbar für alles was ihr für mich getan habt und immer noch tut!

Diese Arbeit widme ich der nächsten Generation – mit besonderem Augenmerk auf Mia, Nico, Pauline, Finn sowie den mir noch unbekanntem Sprösslingen der Familien Gerstner und Dietrich!

Susi. Danke für wirklich alles! Ich hatte eine großartige Zeit und dank dir habe ich mich zu einem besseren Wissenschaftler, Freund und Menschen entwickelt.

„IN QUALITYLAND LAUTET DIE ANTWORT AUF ALLE FRAGEN: OK“

(Marc-Uwe Kling (2017) *Qualityland*)