

Automatisierte Biotechnologie

Kultivierung und Analyse von Biofilmen durch automatisierte Mikrosysteme

PHILLIP LEMKE¹, EDINA KLEIN², JOHANNES GESCHER^{1, 2}, CHRISTOF M. NIEMEYER¹

¹ INSTITUT FÜR BIOLOGISCHE GRENZFLÄCHEN (IBG-1), KARLSRUHER INSTITUT FÜR TECHNOLOGIE (KIT), EGGENSTEIN-LEOPOLDSHAFEN

² INSTITUT FÜR ANGEWANDTE BIOLOGIE (IAB), KARLSRUHER INSTITUT FÜR TECHNOLOGIE (KIT), KARLSRUHE

Biofilms are the most abundant growth form of microorganisms in nature. To exploit these living systems for applications in biotechnology, we have developed a microfluidic cultivation platform with an integrated automatic sampling robot that enables the characterization of biofilms with high spatiotemporal resolution. Moreover, *in situ* imaging and anoxic or gas-consumption based cultivation can be applied. Biocatalytic productivity can be assessed using a spectrum of analytical technologies.

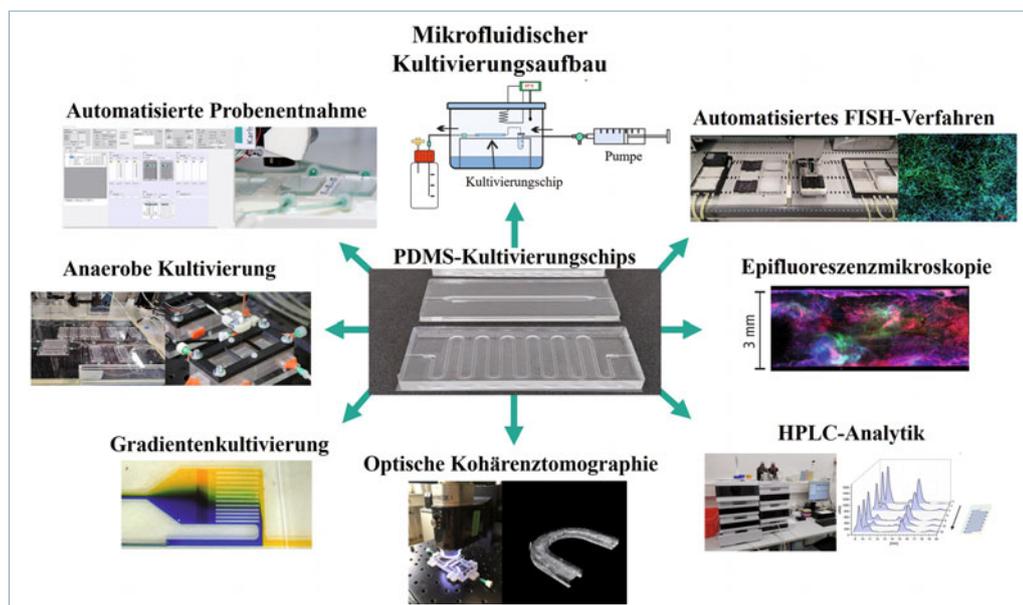
DOI: 10.1007/s12268-020-1346-x
© Die Autoren 2020

■ Wenngleich Biofilme die häufigste Wachstumsform von Mikroorganismen in der Natur darstellen, arbeiten die moderne Mikrobiologie und Biotechnologie heutzutage noch hauptsächlich mit planktonischen Zellen. Die individuellen Zellen eines Biofilms sind in einer dreidimensionalen Struktur aus der extrazellulären Matrix eingebettet, sodass zumeist ein komplexes Konsortium aus verschiedenen Arten gebildet wird, das äußerst widerstands-

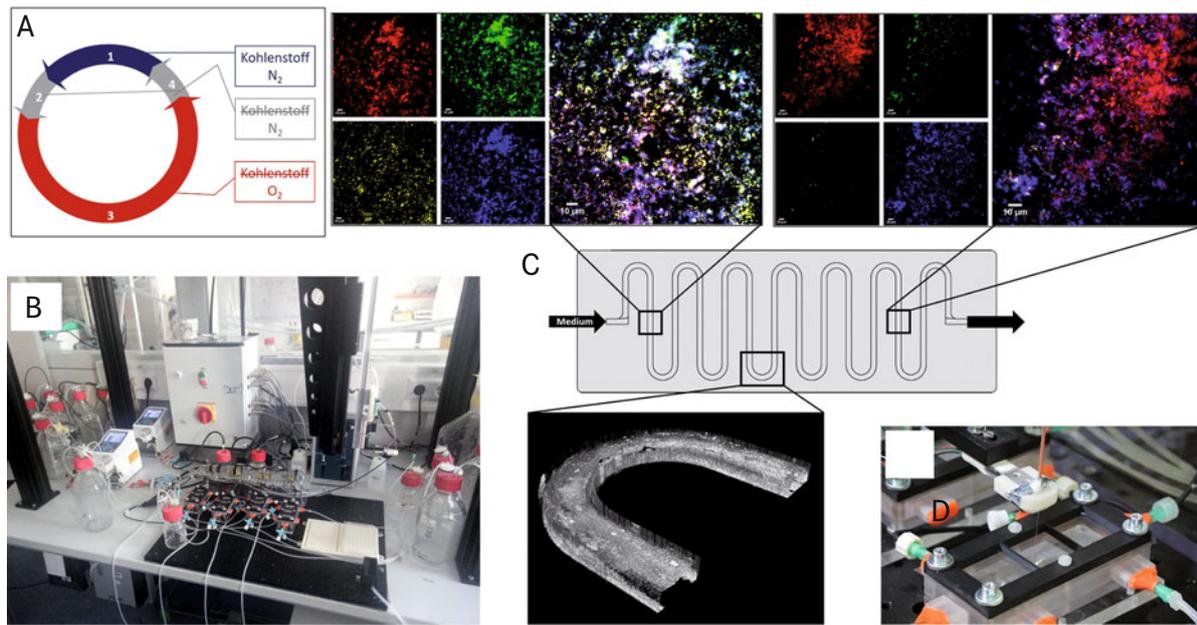
fähig gegenüber rauen Umweltbedingungen ist [1]. Daher werden solche mikrobiellen Gemeinschaften häufig mit krankheitsassoziierten Biofilmen oder Biokorrosion verknüpft. Dennoch werden Biofilme aufgrund ihrer Robustheit heutzutage zur Produktion industriell relevanter Substanzen genutzt [2]. Aufgrund der komplexen und zeitlich dynamischen Zusammensetzung ist jedoch weder die Kultivierung von Biofilmen noch die Analytik

der Mikroorganismen einfach zu bewerkstelligen. Daher ist es wünschenswert, den Biofilm über einen längeren Zeitraum mit verschiedenen Analysemethoden und mit einer möglichst genauen örtlichen und zeitlichen Auflösung zu untersuchen.

Diese Aufgabenstellung wird von einer kürzlich vorgestellten mikrofluidischen Plattform erfüllt, die mikrostrukturierte Biochips auf der Basis von Polydimethylsiloxan (PDMS) nutzt, um Biofilme zu kultivieren [3]. Dieser Ansatz bietet nicht nur hochgradig reproduzierbare Bedingungen für die Kultivierung der Biofilme, sondern ist auch kompatibel mit einer Vielzahl analytischer Methoden und bildgebenden Verfahren wie beispielsweise Photometrie, Chromatographie, Mikroskopie oder optische Kohärenztomographie (OCT) (**Abb. 1**). Zur Steigerung der Analyseeffizienz und zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit werden hierbei maschinengestützte Methoden eingesetzt. Die grundlegenden Vorteile solcher robotergestützten Systeme für eine „automatisierte Biotechnologie“ bestehen darin, dass definierte Versuchsbedingungen eingehalten, komplexe Arbeitsschritte beschleunigt und Abweichungen durch manuelle Handhabung vermieden werden können. Um das Spektrum der automatisierten Biotechnologie für zukünftige



◀ **Abb. 1:** Mikrofluidische Plattform für die Kultivierung und Analyse von Biofilmen. Die PDMS-basierten Kultivierungschips werden mittels Spritzenpumpen kontinuierlich mit Medium versorgt und bilden dadurch den mikrofluidischen Bioreaktor, während Umgebungsparameter wie Temperatur und Feuchtigkeit definiert eingestellt werden. Eine automatisierte Probenentnahme ermöglicht den Einsatz verschiedener Analytikmethoden. Diese umfassen Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH), Mikroskopie, optische Kohärenztomographie (OCT) sowie Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC). Die Plattform eignet sich für an-/oxische sowie gradientenbasierte Kultivierungen.



▲ **Abb. 2:** Kultivierung sowie parallele multianalytische Untersuchung anspruchsvoller Biofilme. **A,** Zur Anzucht mikrobieller Gemeinschaften aus Abwasserreinigungsprozessen erfolgt die Kultivierung unter alternierenden aeroben Hunger- und anaeroben Fütterungsphasen. **B,** Der mikrofluidische Versuchsaufbau ermöglicht die Langzeitkultivierung dieses anspruchsvollen Systems für eine Dauer von mehr als 30 Tagen. **C,** Die mikrobielle Zusammensetzung wurde mittels FISH (oben) und die dreidimensionale Struktur mittels OCT (unten) untersucht. **D,** Proben wurden kontinuierlich während der laufenden anaeroben Kultivierung mithilfe der robotischen Probenahmevorrichtung direkt aus dem Kultivierungskanal entnommen.

Prozesse zu erweitern, werden daher technische Plattformsysteme benötigt, welche die Konzepte der Miniaturisierung und der Automatisierung miteinander vereinen.

Mikrofluidische Plattform zur Kultivierung von Biofilmen

Mikrofluidische Systeme sind ideal geeignet für die Kultivierung von Biofilmen, da sie die natürliche Umgebung des Biofilms imitieren und gleichzeitig hochgradig reproduzierbare Umweltbedingungen hinsichtlich Flussraten und Temperatur bieten können. Solche Systeme, die typischerweise aus einem Mediumreservoir, einer Pumpe zum Transport des Mediums, einer fakultativen Blasenfalle, einer Flusszelle (Kultivierungschip) sowie einem Reservoir für das verbrauchte Medium bestehen, sind lange bekannt [4]. Sie bilden einen kontinuierlich betriebenen Chemostaten, in dem sich kontrollierte, hydrodynamische Eigenschaften einstellen lassen. So kann beispielsweise die Regulierung der Temperatur mittels beheizbarer Chiphalter erfolgen. In dem von uns entwickelten System werden speziell entworfene PDMS-Chips oder PDMS-Glas-Hybridchips als Kultivierungschips verwendet. Die Chips sind einfach und kostengünstig herzustellen, und aufgrund ihrer optischen Eigenschaften können etablierte Analysemethoden für Biofilme wie Epifluoreszenzmikroskopie und OCT angewendet werden [5]. Darüber hinaus lässt sich der mikrofluidische Kultivierungsauf-

bau einfach verändern, sodass beispielsweise eine anoxische Anzucht von Mikroorganismen oder die Integration von Mikrosensoren zur Bestimmung des Sauerstoffgehalts bewerkstelligt werden kann [3].

Automatisiertes Monitoring von Biofilmen

Um eine detaillierte, räumlich aufgelöste Analyse der Zusammensetzung des Biofilms im Verlauf des Kultivierungskanals zu ermöglichen, wurde ein Roboter entwickelt, der die direkte Entnahme von Flüssigkeitsproben aus den mikrofluidischen Kanälen während einer laufenden Kultivierung ermöglicht. Der Roboter verfügt über eine Kanüle, die mit einer Präzision im unteren Mikrometermaßstab frei positionierbar ist, um die PDMS-Schicht der Kultivierungsflusszelle zu durchstechen und Proben der strömenden Kulturflüssigkeit und/oder der Biomasse zu entnehmen. Durch die elastischen Eigenschaften von PDMS schließt sich die Einstichstelle danach wieder, sodass die Kultivierung weitergeführt werden kann [3]. Für die einfache und komfortable Programmierung und Bedienung des Systems wurde eine Kontrollsoftware mit einer graphischen Benutzeroberfläche entwickelt.

Die mikrofluidische Plattform ist kompatibel mit verschiedenen analytischen Methoden, die zur Untersuchung der kultivierten Biofilme eingesetzt werden können. Nicht-invasive bildgebende Verfahren, wie die OCT

oder Mikroskopie, können dabei in der Regel am lebenden Biofilm unter Flussbedingungen durchgeführt werden. Auch die metabolische Aktivität des Biofilms lässt sich am lebenden System untersuchen, indem Flüssigkeitsproben mit dem oben beschriebenen Roboter entnommen und anschließend mithilfe bioanalytischer Methoden charakterisiert werden. Für die Untersuchung der vom Biofilm produzierten Metaboliten bieten sich typischerweise die Ionenchromatographie und die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) an. Auch die mikrobielle Zusammensetzung des Biofilms lässt sich so sehr detailliert untersuchen, z. B. indem die DNA und RNA der Proben mithilfe einer Sequenzierung analysiert wird. Da die robotergestützte Probenentnahme nicht-destruktiv und mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung erfolgt, lassen sich mit diesem Vorgehen wichtige Erkenntnisse über die Dynamik von Biofilmen erzielen.

Ein weiterer Vorteil der mikrofluidischen Plattform ist ihre vollständige Kompatibilität mit der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH), die als Goldstandard für die Charakterisierung komplexer mikrobieller Lebensgemeinschaften verwendet wird. Die FISH-Methode ist eine Endpunktanalyse, bei der ribosomale RNA-Moleküle der Bakterien mithilfe fluoreszenzmarkierter Oligonukleotidsonden detektiert werden, um spezifisch phylogenetische Gruppen der Mikroorganismen zu identifizieren. Die FISH-

Methode erfordert zahlreiche Wasch- und Inkubationsschritte, die üblicherweise per Hand durchgeführt werden müssen. Aufgrund der Verfügbarkeit einer speziellen Schnittstelle können die mikrofluidischen Chips dagegen vollautomatisiert prozessiert werden. Die anschließende Analyse erfolgt dann mithilfe automatisierter Fluoreszenzmikroskopie und kann den gesamten Kultivierungskanal umfassen.

Anwendung und Ausblick

Die Eignung der Biochip-Plattform für die detaillierte Untersuchung von Biofilmen wurde bereits anhand verschiedener mikrobieller Systeme verifiziert. Exemplarisch wurde eine artifiziale Gemeinschaft aus dem anaeroben *Geobacter sulfurreducens* und einer aeroben *Escherichia coli*-Mutante untersucht. Da *G. sulfurreducens* auf den Verbrauch von Sauerstoff durch *E. coli* angewiesen ist, differenziert sich der Biofilm über die Fließstrecke des mikrofluidischen Kanals, sodass eine räumliche Kompartimentierung stattfindet [3]. Auch wurde die Plattform erfolgreich eingesetzt, um rekombinante *E. coli*-Biofilme zu charakterisieren, die biokatalytische Reaktionen durchführen können [3], oder um Modellsysteme für Abwasserreinigungsprozesse zu entwerfen, die auf der Aktivität mikrobieller Gemeinschaften in Granula beruhen (Abb. 2).

Diese Fallbeispiele zeigen deutlich, dass die entwickelte mikrofluidische Kultivierungsplattform für Biofilme mit dem robotergestützten Probenahmesystem einen wichtigen Schritt in Richtung automatisierter Biotechnologie darstellt. Hierdurch wird eine standardisierte Kultivierung nahezu beliebiger Biofilme möglich, die mit bisherigen Methoden nicht erreichbar ist. Technische Weiterentwicklungen, beispielsweise in Bezug auf die nahtlose Integration einer Hochdurchsatzsequenzierung oder von Metabolomik-Analysemethoden wie Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie lassen erwarten, dass der Nutzen und die breite Anwendbarkeit der hier vorgestellten Chip-Plattform noch vergrößert werden können. Dies soll vor allem zur Entwicklung von Biofilmen für technische Anwendungen genutzt

werden. Die hier aufgezeigte Symbiose von Ingenieurwissenschaften, Biologie und Biotechnologie könnte unter anderem dabei helfen, neue Anwendungsfelder zu erschließen, in denen mikrobielle Lebensgemeinschaften für nachhaltige Produktionsprozesse eingesetzt werden.

Literatur

- [1] Stoodley P, Sauer K, Davies DG et al. (2002) Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 56:187–209
- [2] Halan B, Buehler K, Schmid A (2012) Biofilms as living catalysts in continuous chemical syntheses. *Trends Biotechnol* 30:453–465
- [3] Hansen SH, Kabbeck T, Radtke CP et al. (2019) Machine-assisted cultivation and analysis of biofilms. *Sci Rep* 9:8933
- [4] Pamp SJ, Sternberg C, Tolker-Nielsen T (2009) Insight into the microbial multicellular lifestyle via flow-cell technology and confocal microscopy. *Cytom Part A* 75A:90–103
- [5] Wagner M, Horn H (2017) Optical coherence tomography in biofilm research: a comprehensive review. *Biotechnol Bioeng* 114:1386–1402

Funding: Open Access funding provided by Projekt DEAL.

Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Christof M. Niemeyer
 Institut für Biologische Grenzflächen (IBG-1)
 Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
 Hermann-von-Helmholtz-Platz 1
 D-76344 Eggenstein-Leopoldshafen
 niemeyer@kit.edu
 www.niemeyer-lab.de

AUTOREN



Christof M. Niemeyer

1984–1989 Chemiestudium an der Universität Marburg. 1990–1992 Promotion in der Organischen Chemie bei Prof. Dr. M. T. Reetz, Max-Planck-Institut für Kohlenforschung, Mülheim an der Ruhr. 1992–1994 Postdoktorand bei Prof. Dr. R. W. Read, University of New South Wales, Sydney, Australien, und bei Prof. Dr. C. R. Cantor, Center for Advanced Biotechnology, Boston University, USA. 1994–2002 Habilitation an der Universität Bremen. 2002–2012 Professur an der TU Dortmund. Seit 2012 Professor für Chemische Biologie und Direktor des Instituts für Biologische Grenzflächen (IBG-1) am Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Eggenstein-Leopoldshafen.



Johannes Gescher

1996–2001 Biologiestudium an der Universität Freiburg. 2001–2005 Promotion. 2005–2006 Postdoc im Labor von Prof. Dr. A. M. Spormann an der Stanford University, USA. 2008–2011 Vertretungsprofessor für Mikrobiologie der Universität Freiburg. Seit 2011 Professor für Angewandte Biologie am Institut für angewandte Biowissenschaften (IAB) am Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Karlsruhe.



Phillip Lemke

2012–2019 Bachelor- und Masterstudiengang Bioingenieurwesen am Karlsruher Institut für Technologie (KIT). Seit 2019 Doktorand in der Arbeitsgruppe Niemeyer am Institut für Biologische Grenzflächen (IBG-1), Eggenstein-Leopoldshafen.



Edina Klein

2013–2016 Bachelorstudium Biologie an der Universität Leipzig. 2016–2018 Masterstudium Biologie am Karlsruher Institut für Technologie (KIT). Seit 2019 Promotion in der Abteilung für Angewandte Biologie in der Arbeitsgruppe Gescher am Institut für angewandte Biowissenschaften (IAB), Karlsruhe.

Hier steht eine Anzeige.