

Kultivierungsplattform

Makroporöse Silikonschwämme zur Erforschung unbekannter Mikroben

LAURA MEISCH, MARTA VELAZ MARTÍN, KERSTEN S. RABE, CHRISTOF M. NIEMEYER
INSTITUT FÜR BIOLOGISCHE GRENZFLÄCHEN 1 (IBG-1), BIOMOLEKULARE MIKRO-
UND NANOSTRUKTUREN, KARLSRUHER INSTITUT FÜR TECHNOLOGIE (KIT)

Microorganisms are the most abundant living organisms on Earth and are essential for the functioning of ecosystems. However, more than 99 percent of them are uncharacterized and are referred to as microbial dark matter (MDM). Their discovery is limited partly due to the lack of suitable cultivation methods. A novel cultivation method using a macroporous silicon matrix addresses this problem. Its applicability has been demonstrated in the laboratory with model organisms and in three natural environments.

DOI: 10.1007/s12268-024-2089-x
© Die Autorinnen und Autoren 2024

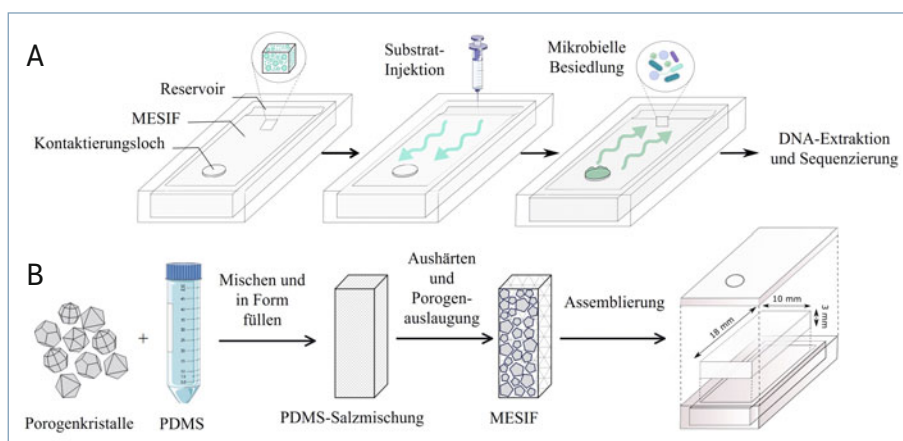
■ Mikroorganismen sind integraler Bestandteil ökologischer Prozesse, wie dem Stickstoff-, Kohlenstoff- oder Phosphorkreislauf. Wissen über die Stoffwechselwege der Mikroorganismen ist nicht nur wichtig für ein besseres Verständnis unserer Umwelt, sondern auch, um ihr großes Potenzial zu nutzen [1–4]. Ihre

Nutzbarmachung ist jedoch dadurch limitiert, dass mehr als 99 Prozent der auf der Erde vorhandenen Mikroorganismen mit den gegenwärtigen Methoden nicht angereichert oder kultiviert werden können [5]. Diese Organismen werden deshalb auch als „mikrobielle dunkle Materie“ (MDM) bezeichnet. In

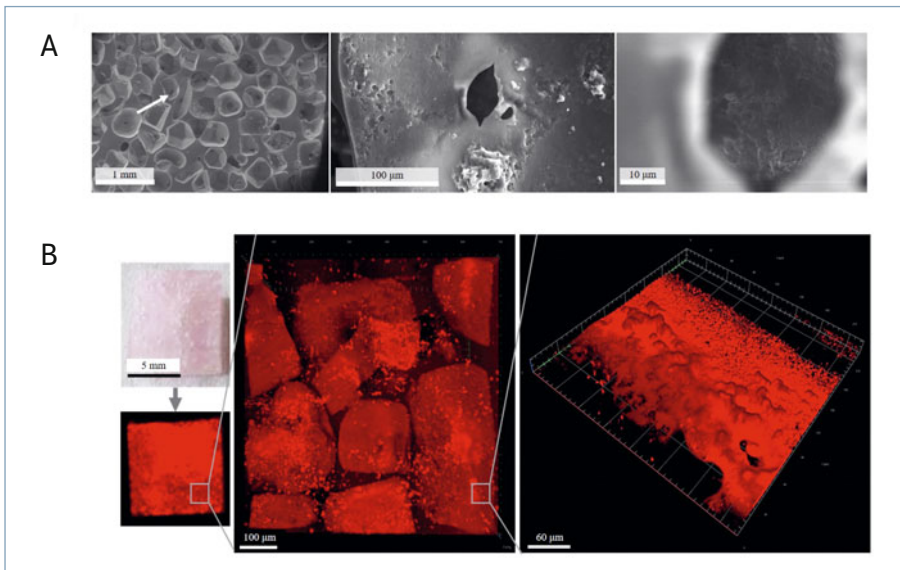
der Natur wachsen viele dieser Organismen in großen Multispezies-Gemeinschaften, den Biofilmen. Darin sind die Organismen umgeben von einer extrazellulären Matrix, die u. a. Polysaccharide, Proteine, DNA und Lipide enthält und einen Schutz vor äußeren Einflüssen, wie Oxidation, Bioziden oder Trockenheit, bietet [6]. Die DNA-Sequenzierung und insbesondere die Fortschritte im Bereich des Next Generation Sequencing ermöglichen die Identifizierung der am Biofilm beteiligten Mikroorganismen und die Analyse ihrer zeitlichen Interaktionen. Es besteht aber weiterhin eine bedeutende Forschungslücke bei der Kultivierung von Umweltmikrobiomen als Biofilm im Labor [7]. Eine Lösung für dieses technische Problem können dreidimensionale, poröse Matrix-Materialien darstellen.

Silikonschwämme zur Kultivierung von Mikroben

Hier eignet sich insbesondere das gut etablierte elastomere Polymer Polydimethylsiloxan (PDMS): Es ist transparent, hydrophob, kaum autofluoreszierend, biokompatibel und gaspermeabel und kann mithilfe der vielfältigen Silanisierungsschemie mit Amino-, Epoxy-, Hydroxy- oder anderen funktionellen Gruppen auf der Oberfläche modifiziert werden. Daraus lassen sich poröse PDMS-Materialien (PDMS-Schwämme) herstellen, die aufgrund ihrer mechanischen Eigenschaften und ihres hohen Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnisses vielversprechende Kandidaten für die Kultivierung von Mikroorganismen als Biofilme sind [8]. So entwickelten wir auf Basis dieser PDMS-Schwämme kürzlich ein Chip-basiertes Kultivierungssystem, das einen PDMS-basierten makroporösen elastomeren Silikonschwamm (*macroporous elastomeric silicone foam*, MESIF), ein Reservoir und eine Öffnung für den Kontakt des MESIFs mit der Umgebung enthält (Abb. 1A, [9]). Um die poröse Struktur des MESIFs zu erzeugen, verwenden wir ein Porogen mit einer definierten Kristallgröße, das mit dem PDMS vermischt und ausgehärtet wird (Abb. 1B). Anschließend wird das Porogen



▲ **Abb. 1:** Chip-Konzept und Herstellung. **A,** Der MESIF-Chip (*macroporous elastomeric silicone foam*) besteht aus einer makroporösen Matrix, einem Reservoir und einem Kontaktierungsloch. Über das Reservoir wird mithilfe einer Kanüle ein Substrat mit einem Selektionsfaktor in den Chip injiziert, bis der MESIF gesättigt ist. Nachdem der MESIF-Chip im gewünschten Habitat platziert wurde, wird er über das Kontaktierungsloch selektiv von Mikroorganismen besiedelt. Diese können anschließend mittels DNA-Extraktion, Sequenzierung und bioinformatischer Auswertung identifiziert werden. **B,** Herstellung des MESIFs durch Mischen des Porogens mit einer PDMS-Präpolymerlösung. Die Mischung wird geformt, ausgehärtet und das Porogen anschließend ausgelagert. Der MESIF wird in den in A gezeigten Chip eingesetzt.



▲ **Abb. 2:** Morphologie und bakterieller Bewuchs des MESIF. **A**, elektronenmikroskopische Aufnahmen des MESIF-Materials. Offene Verbindungen zwischen zwei Poren (mit einem Pfeil markiert) zeigen bei zunehmender Vergrößerung die Interkonnektivität der Matrix. **B**, Wachstum von *E. coli*. Konfokale Mikroskopieaufnahmen der MESIF-Struktur mit Zellen, die in dichten Populationen und Biofilmen wachsen.

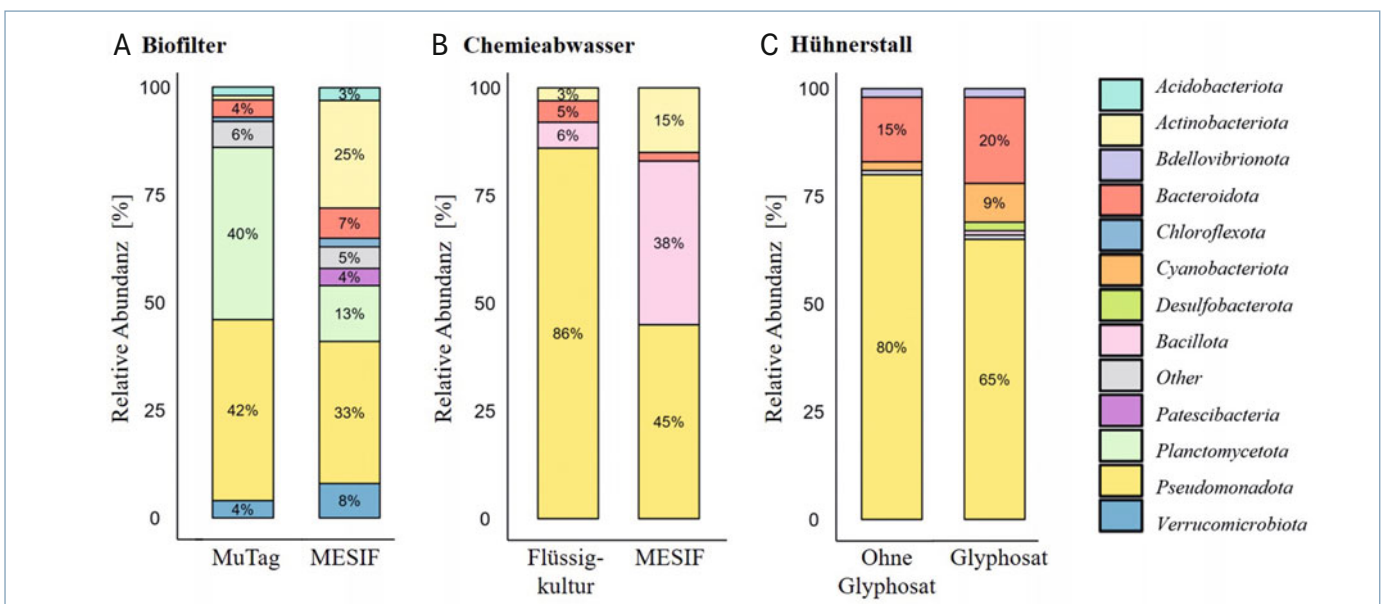
ausgewaschen, sodass nur noch das PDMS-Gerüst als eine vernetzte makroporöse Struktur zurückbleibt (**Abb. 2A**).

Für die initiale Charakterisierung der Besiedlung des MESIFs mit Mikroorganismen nutzten wir den Modellorganismus *Escherichia coli*, mit einem zusätzlichen Plasmid, das für rot fluoreszierendes Protein

codiert (**Abb. 2B**). Hiermit konnten wir die Ausbreitung des Bakteriums in MESIF-Materialien mit unterschiedlicher Porengröße und Oberflächenmodifikation mittels fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen nachvollziehen. Es stellte sich heraus, dass *E. coli* eher größere Poren und hydrophilere Oberflächen bevorzugt.

Validierung des MESIF-Chips in drei komplexen Habitaten

Um die Eignung des Chip-Systems für die Beprobung komplexer Habitats und die Anreicherung bisher wenig beschriebener Spezies zu validieren, untersuchten wir drei unterschiedliche Habitate: den Biofilter eines Zander-Aufzuchtbeckens, Chemieabwasser des KIT in Karlsruhe und die Luft eines Hühnerstalls. Zunächst wurde der Biofilter eingesetzt, um das MESIF-Material mit einem kommerziell erhältlichen Bioträgermaterial (MuTag™) zu vergleichen. Die Analyse der auf den Materialien angewachsenen Biofilme durch Amplikon-Sequenzierung zeigte, dass der MESIF eine deutlich breitere Verteilung der mikrobiellen Phyla im Vergleich zu dem MuTag ermöglicht (**Abb. 3A**). Während der konventionelle Träger vor allem von den bereits gut charakterisierten Phyla *Pseudomonadota* und *Planctomycetota* überwuchert wird, wachsen im MESIF hingegen Mitglieder des Phylums *Patescibacteria*. Diese sind dafür bekannt, schwierig kultivierbar zu sein und der mikrobiellen dunklen Materie anzugehören. Neben der turbulenten flüssigen Umgebung im Biofilter untersuchten wir die Luft eines Hühnerstalls und verglichen die mikrobielle Anreicherung im MESIF-Kultivierungschip mit einer entsprechenden Flüssigkultur (**Abb. 3B**). Diese Untersuchung bestätigte die Vorteile der Kultivierung von Mikroorganismen in einer dreidimensionalen



▲ **Abb. 3:** Phylogenetische Verteilung von Mikroorganismen aus drei komplexen Umwelthabitats. Beprobte wurden der Biofilter eines Zander-Aufzuchtbeckens, Chemieabwasser des KIT in Karlsruhe und die Luft eines Hühnerstalls. Dabei wurden der MESIF mit **(A)** MuTag™-Bioträger und **(B)** Flüssigkultur verglichen. Außerdem wurde **(C)** Glyphosat als potenzieller Selektionsfaktor in MESIF-Materialien gegeben, um die selektive Anreicherung von mikrobiellen Gemeinschaften beobachten zu können.

Matrix, da sich im MESIF erneut eine breite und homogene Verteilung der Phyla zeigt, wohingegen die Flüssigkultur zu mehr als Dreivierteln aus Mitgliedern des Phylums *Pseudomonadota* besteht.

Bei der Beprobung des Chemieabwassers nutzen wir das Chip-Reservoir, um den Effekt unterschiedlicher Kohlenstoffquellen zu untersuchen. Wir verwendeten Glyphosat als Kohlenstoffquelle, um Gemeinschaften anzureichern, die Hinweise auf den Abbau dieses allgegenwärtigen Herbizids geben könnten. Hier zeigte die bioinformatische Untersuchung u. a., dass das Phylum Desulfobacterota im Vergleich zu Chips ohne Glyphosat angereichert wird (**Abb. 3C**). Da Desulfobacterota schwache organische Säuren verstoffwechseln können, weist dies auf mögliche metabolische Abbaumechanismen von Glyphosat hin.

Plattform, um mikrobielle dunkle Materie anzureichern

Mit dem neuentwickelten MESIF-System können wir Mikrobiome direkt in der Umwelt kultivieren und anreichern. Zu den Vorteilen des Kultivierungschips gehören die makroporöse Matrix, die die Ansiedlung der Mikroorganismen als Biofilm ermöglicht, die einfache und vielfältige chemische Modifizierung der Oberfläche des Materials, die auch eine Modulierung der Oberflächenbenetzung erlaubt, sowie die Möglichkeit, das Reservoir zu nutzen, um beliebige Medien für eine gezielt Anreicherung einzusetzen. Die ersten Ergebnisse legen nahe, dass die hier vorgestellten Chips eine sehr nützliche Plattform sind, um unterschiedliche Konsortien von Mikroorganismen selektiv anzureichern und dabei insbesondere auch bislang unklassifizierte Mikroorganismen der mikrobiellen dunklen Materie einzuschließen.

Danksagung

Diese Arbeit wurde durch das Helmholtz-Programm „Materials Systems Engineering“ unter dem Thema „Adaptive und biostruktive Materialsysteme“ unterstützt. Die Autor:innen bedanken sich für die Förderung durch das KIT EXU-Projekt DigiteLiSE und das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF, Projekt 161L0284A MicroMatrix).

Literatur

- [1] Cavicchioli R, Ripple WJ, Timmis KN et al. (2019) Scientists' warning to humanity: microorganisms and climate change. *Nat Rev Microbiol* 17: 569–586
- [2] Lewis WH, Tahon G, Geesink P et al. (2021) Innovations to culturing the uncultured microbial majority. *Nat Rev Microbiol* 19: 225–240
- [3] Antranikian G, Streit WR (2022) Microorganisms harbor keys to a circular bioeconomy making them useful tools in fighting plastic pollution and rising CO2 levels. *Extremophiles* 26: 10
- [4] Glockow T, Velaz Martín M et al. (2023) A photobioreactor for production of algae biomass from gaseous emissions of an animal house. *Appl Microbiol Biotechnol* 107: 7673–7684
- [5] Lock C (2015) Mining the microbial dark matter. *Nature* (London, UK) 522: 270–273
- [6] Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U et al. (2016) Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* 14: 563–575
- [7] Liu S, Moon CD, Zheng N et al. (2022) Opportunities and challenges of using metagenomic data to bring uncultured microbes into cultivation. *Microbiome* 10: 76
- [8] Zhu D, Handschuh-Wang S, Zhou X (2017) Recent progress in fabrication and application of polydimethylsiloxane sponges. *J Mater Chem A* 5: 16467–16497
- [9] Zobeir AE, Meisch L, Martin MV et al. (2022) Macroporous Silicone Chips for Decoding Microbial Dark

Matter in Environmental Microbiomes. *ACS Appl Mater Interfaces* 14: 49592–49603

Funding note: Open Access funding enabled and organized 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 1 –
Biomolekulare Micro- und Nanostrukturen
Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
Hermann-von-Helmholtz-Platz 1
D-76344 Eggenstein-Leopoldshafen
niemeyer@kit.edu
www.niemeyer-lab.de

AUTORINNEN UND AUTOREN



Laura Meisch

2015–2022 Bachelor und Master Bioingenieurwesen am Karlsruher Institut für Technologie (KIT). Seit 2022 Doktorandin in der Arbeitsgruppe Niemeyer am Institut für Biologische Grenzflächen (IBG-1), Eggenstein-Leopoldshafen.



Marta Velaz Martín

2016–2022 Bachelor und Master Chemische Biologie am KIT. Seit 2022 Doktorandin in der Arbeitsgruppe Niemeyer.



Kersten S. Rabe

1997–2004 Biochemiestudium an der Universität Bayreuth. 2004–2009 Promotion bei Prof. Dr. C. M. Niemeyer, TU Dortmund. 2010–2013 PostDoc bei Prof. Dr. F. H. Arnold, California Institute of Technology, Pasadena, USA. Seit 2013 Gruppenleiter für Molekulare Evolution und Biokatalyse am Institut für Biologische Grenzflächen (IBG-1) am KIT.



Christof M. Niemeyer

1984–1992 Chemiestudium und Promotion. 1992–1994 PostDoc 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 KIT.