

Projekt „BactoCat“-Tropfenbasierte Mikrofluidik für die Untersuchung von Boden-Mikroorganismen und Mikroorganismengemeinschaften für neue biotechnologische Prozesse

A. Groß¹, K. Wetzel¹, D. Kürsten¹, J. Cao¹, K. Bergmann¹, C. Schmook¹, L. Hafermann¹, A. Mendel², S. Löbecke², M. Roth³, K. Martin³, Th. Henkel⁴, M. Kielpinski⁴, G. Gastrock⁵, S. Wiedemeider⁵, B. Funai⁶, E. Kothe⁶, J.M. Köhler¹

¹Institut für Chemie und Biotechnologie, Institut für Mikro und Nanotechnologie, Technische Universität Ilmenau; ²Fraunhofer Institut für Chemische Technologie, Pfinztal
³Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e. V. – Hans-Knöll-Institut (HKI), Jena; ⁴Leibniz-Institut für Photonische Technologien (IPHT), Jena
⁵Institut für Bioprozess- und Analysenmesstechnik e.V. (iba), Heiligenstadt; ⁶Institut für Mikrobiologie, Friedrich-Schiller-Universität, Jena.

Vision

Tropfenbasierte Mikrofluidik als Schlüsseltool für die Materialwende

Die Suche nach neuen Mikroorganismen mit nützlichen metabolischen Aktivitäten verlangt nach einer geeigneten Screening-Technologie, welche neben Hochdurchsatz-Aspekten auch hochaufgelöste Prozessdaten liefern kann. Dazu sind Verfahren notwendig, die einen hohen Probendurchsatz mit einer hohen Aussagekraft bezüglich Wachstum und Syntheseleistung kombinieren. Diese Ziel kann durch die tropfenbasierte Mikrofluidik erreicht werden. Im Rahmen des BactoCat-Projektes wurde ein Mehrvolumen-Bereichs-Konzept verfolgt, welches je nach Anforderung - tropfenbasierte Screening-Systeme in vier Volumenbereichen zur Verfügung stellt. (siehe Abbildung 1).

Projektziele

Suche nach mikrobiellen Syntheseleistungen durch tropfenbasierte Screening-Technologien

Der durch einen großen gesellschaftlichen Konsens getragenen Energiewende, muss im Hinblick auf das Ziel eines nachhaltigen Umgangs mit natürlichen Ressourcen eine „Materialwende“ folgen. Voraussetzung für den Übergang etablierter Prozesstechnologien im Bereich der Material- und Chemiewirtschaft hin zu einer „Bio-Ökonomie“, ist die Verfügbarkeit alternativer „Bio-Prozesse“. Der Syntheseleistung von Mikroorganismen und vor allem der Suche nach neuen Mikroorganismen und Charakterisierung von deren Syntheseleistungen kommt dabei eine zentrale Bedeutung zu. Die tropfenbasierte Mikrofluidik bietet hier Lösungsansätze, welche neue, effiziente Screening-Strategien ermöglicht.

Strategie

Mikrofluidisches Mehrvolumen-Bereichs-Konzept

Um den unterschiedlichen Anforderungen der verschiedenen Screening-Ansätze gerecht zu werden, wurden im Rahmen des BactoCat Projektes ein Mehrvolumenbereichs-Konzept verfolgt, welches tropfenbasierte System in vier Volumenbereichen zur Verfügung stellt (siehe Abbildung 1).

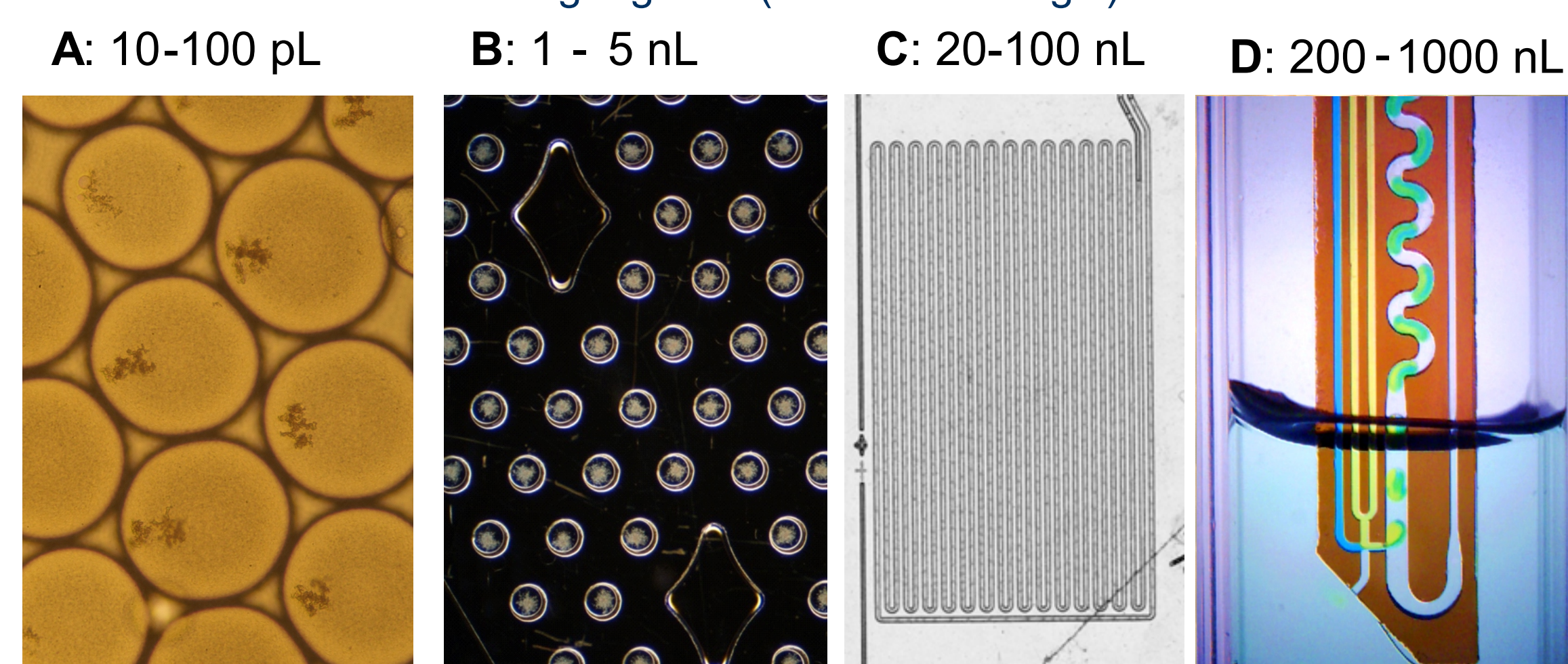


Abbildung 1: Technologische Mehrvolumenbereich-Strategie. **A:** Emulsionstechnik, (tensidstabilisiert) für den 10-50 pL-Bereich; Readout: Imaging; Applikationen: statistische Wachstumsversuche, Cherry-Picking. **B:** Kapillarspaltträger für ortsfeste 4.5 nL Tropfchen; Readout: Imaging; Applikationen: Langzeitkultivierung, morphologische Studien, Co-Kultivierung. **C:** Mikrofluid-Chips mit verschiedenen fluidischen Funktionselementen für 100 nL Tropfenvolumen; Readout: Imaging; Applikationen: Parameter-Screening, Serial-Transfer-Experimente, komplexe Operationen. **D:** Segmented-Flow-Technik mit 200 - 500 nL Tropfenvolumen; Readout: Photo- Fluorimetrie; Applikationen: Dosis / Wirkungskurven, Medienoptimierung [1].

Mikrofluidische Screening- und Analysen-Systeme

Das Projektkonsortium hat für jeden Volumenbereich Screening-Systeme mit unterschiedlichen Applikationsschwerpunkten entwickelt, welche je nach Fragestellung modular kombiniert werden können.

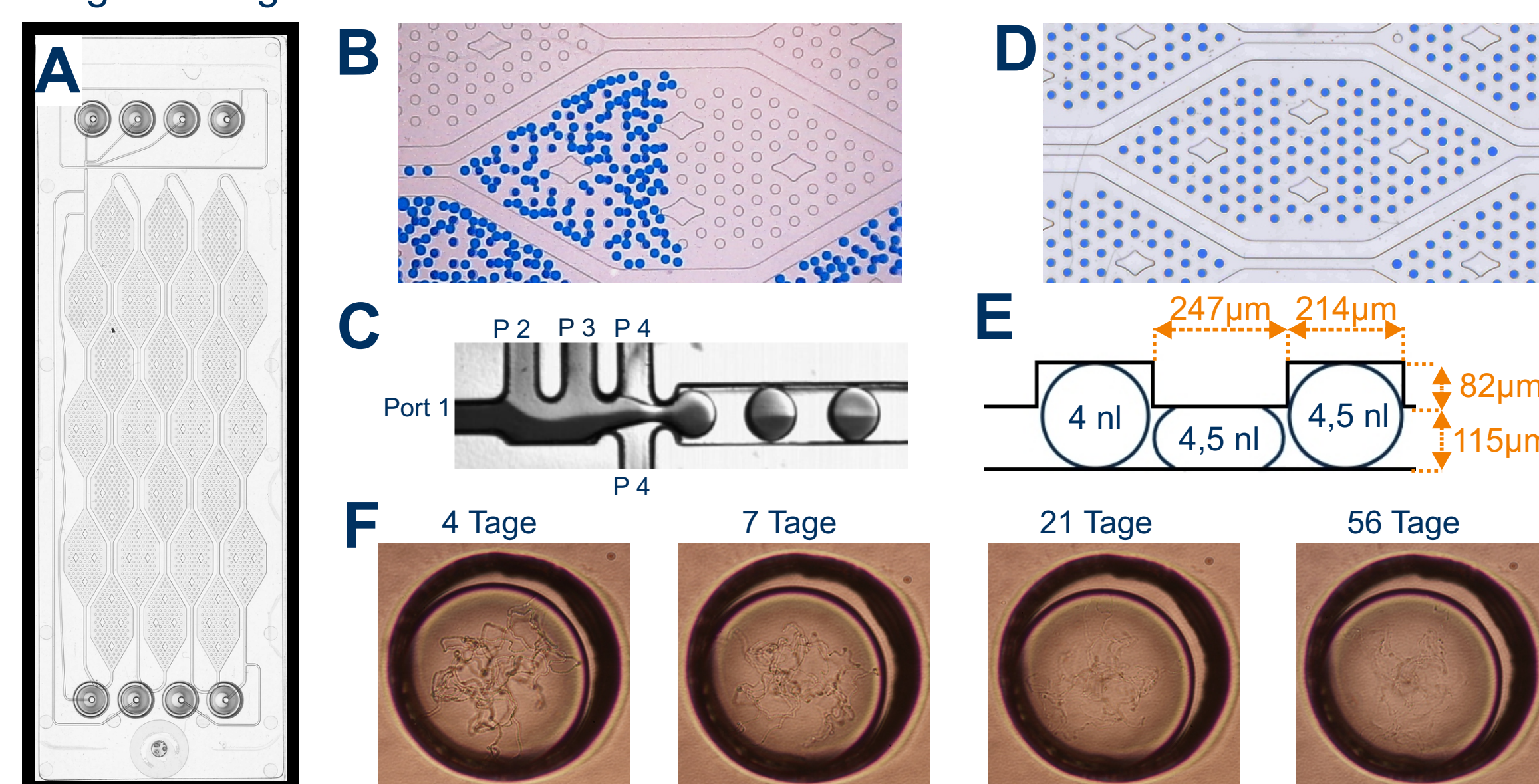


Abbildung 2: **A:** Kapillarspaltträger für 2592 Tropfen mit 4.5 nL Volumen. **B:** Befüllung mit Tropfen. **C:** Mehrfachdüse zur Erzeugung der 4.5 nL Tropfen. **D:** Befülltes Array. **E:** Querschnitt und Dimensionen der Tropfenfallen. **F:** Bilder einzelner Tropfenfallen: Beobachtung der morphologischen Änderung eines Streptomyceten-Myzels über 56 Tage hinweg.

Ergebnisse:

Isolation unbekannter / neuer Mikroorganismen

Das Verfahren des Segmentierten-Flusses wurde erfolgreich angewendet, neue / unbekannte Mikroorganismen aus schwermetall-belasteten Bodenproben zu selektieren [2]. Das Prinzip ist in Abb. 3 dargestellt.

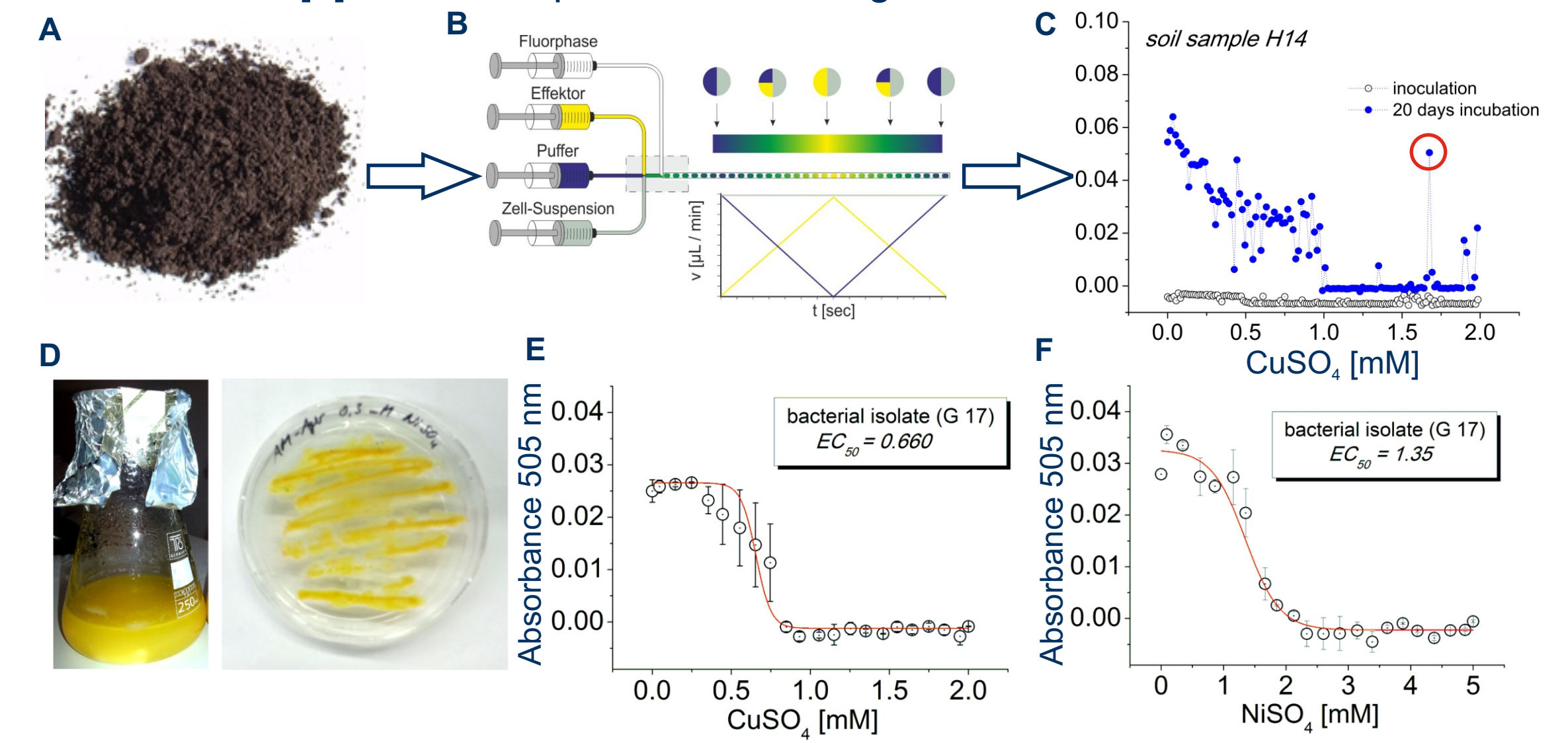


Abbildung 3: Strategie zur tropfenbasierten Selektion von Mikroorganismen. **A:** Isolation von Sporen und Bakterien aus einer Bodenprobe **B:** Überführung in Tropfen mit aufsteigendem Schwermetallgehalt **C:** photo-fluorimetrische Messung nach Inkubation und Selektion auffälliger Tropfen (rot markiert) **D:** Unbekannter Stamm, der ein gelbes Pigment bildet. **E:** Schwermetalltoleranz gegen Kupfer-Ionen **F:** Schwermetalltoleranz gegen Nickel-Ionen.

Mikroorganismengemeinschaften - Profiling von belasteten Bodenproben

Die Charakterisierung von Mikroorganismen-Gemeinschaften, die in Schwermetall-belasteten Böden vorherrschen, ist ein komplexes Problem. Mit Hilfe der tropfenbasierten Mikrofluidik ist es gelungen, charakteristische Profile für verschiedene Bodenproben zu erhalten, welche Rückschlüsse auf die Konsortien zulassen [3,4].

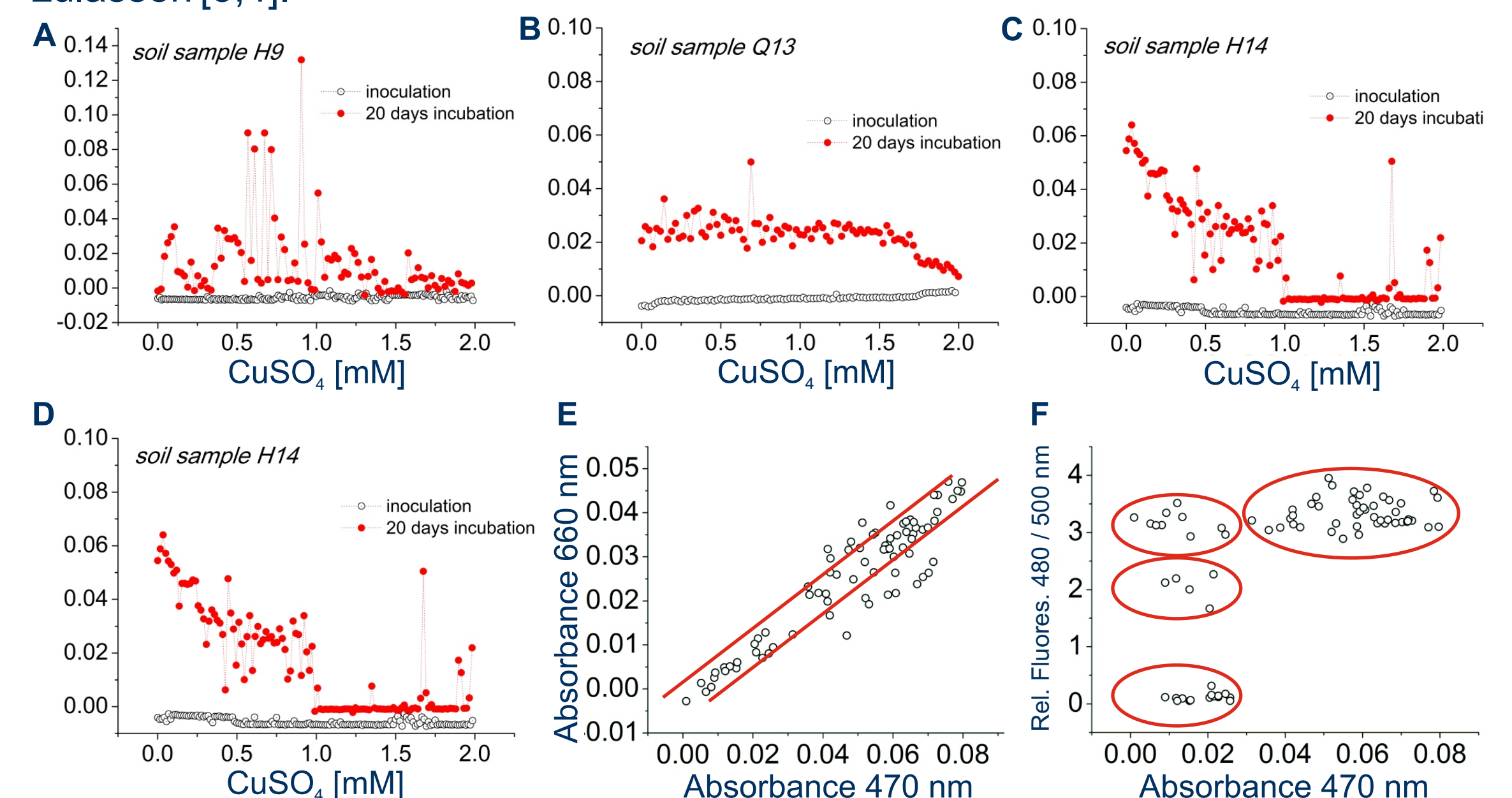


Abbildung 4: Profiling von Mikrobengemeinschaften. **A - D:** Antwortverhalten von Mikroorganismengemeinschaften auf Bodenproben auf ansteigenden Kupfer-Stress **E:** Korrelation der photometrischen Signale bei unterschiedlichen Wellenlängen zeigen keine Ausfälligkeiten (Streulicht durch Wachstum). **F:** Die Korrelation der fluorimetrischen Signale mit photometrischen Signalen zeigen mehrere Klassen von Organismen.

Tropfenbasierte SERS-Messung

Zur Charakterisierung der chemischen Zusammensetzung von Segmenten wurde ein SERS-System entwickelt, welches Tropfensequenzen auf SERS-Substrate matrixartig absetzt und SERS-Spektren aufnimmt (Siehe Abbildung 5).

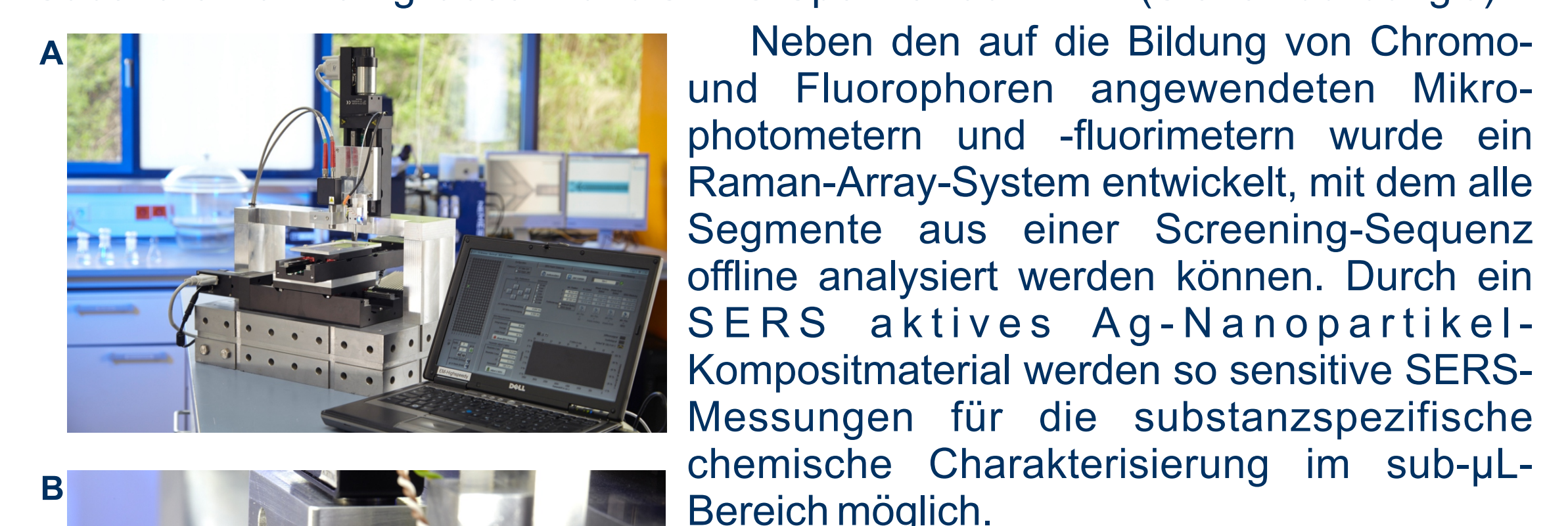


Abbildung 5: **A:** SERS-System **B:** Absetzen von 350-nL-Segmenten auf SERS-Spots. **C:** Bild eines Ag-Nanopartikel-SERS-Spots nach Absetzen eines Farbstoffsegments. **D:** Raman-Image des Spots C **E:** SERS-Signale einer Segmentsequenz mit *Bacillus Psychrodurans* nach Stimulation durch Kupfer-Ionen in aufsteigender Konzentration.

System Beispiele