

Mikrotoxikologie

Mikrofluidik – großes Potenzial in kleinen Tropfen

JIALAN CAO¹, TIM SCHÜLER², J. MICHAEL KÖHLER¹

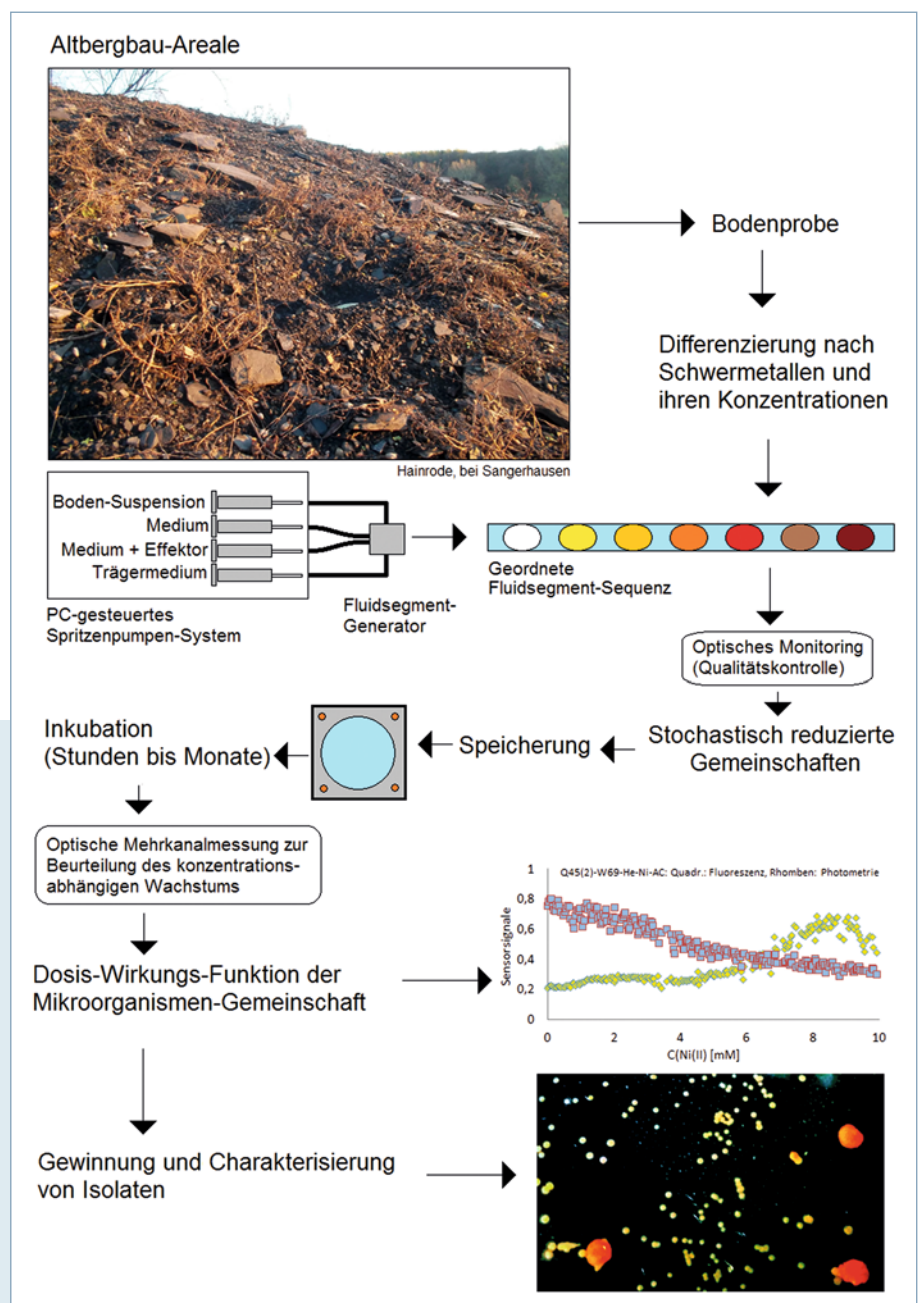
¹ INSTITUT FÜR MIKRO- UND NANOTECHNOLOGIEN, INSTITUT FÜR CHEMIE UND BIOTECHNIK, TU ILMENAU

² THÜRINGER LANDESAMT FÜR DENKMALPFLEGE UND ARCHÄOLOGIE, ERFURT

The technique of micro segmented flow is well applicable for the investigation of soil microorganisms. It supplies highly resolved dose/response functions for whole microbial communities as well as for single strains. In addition, it can be used in the search for microbial strains with special tolerance features, for example for enhanced concentrations of cobalt and nickel. Such strains have been found in soil samples from the surface of ancient copper mining areas and metal-contaminated soils from archaeological excavations.

DOI: 10.1007/s12268-017-0816-2
© Springer-Verlag 2017

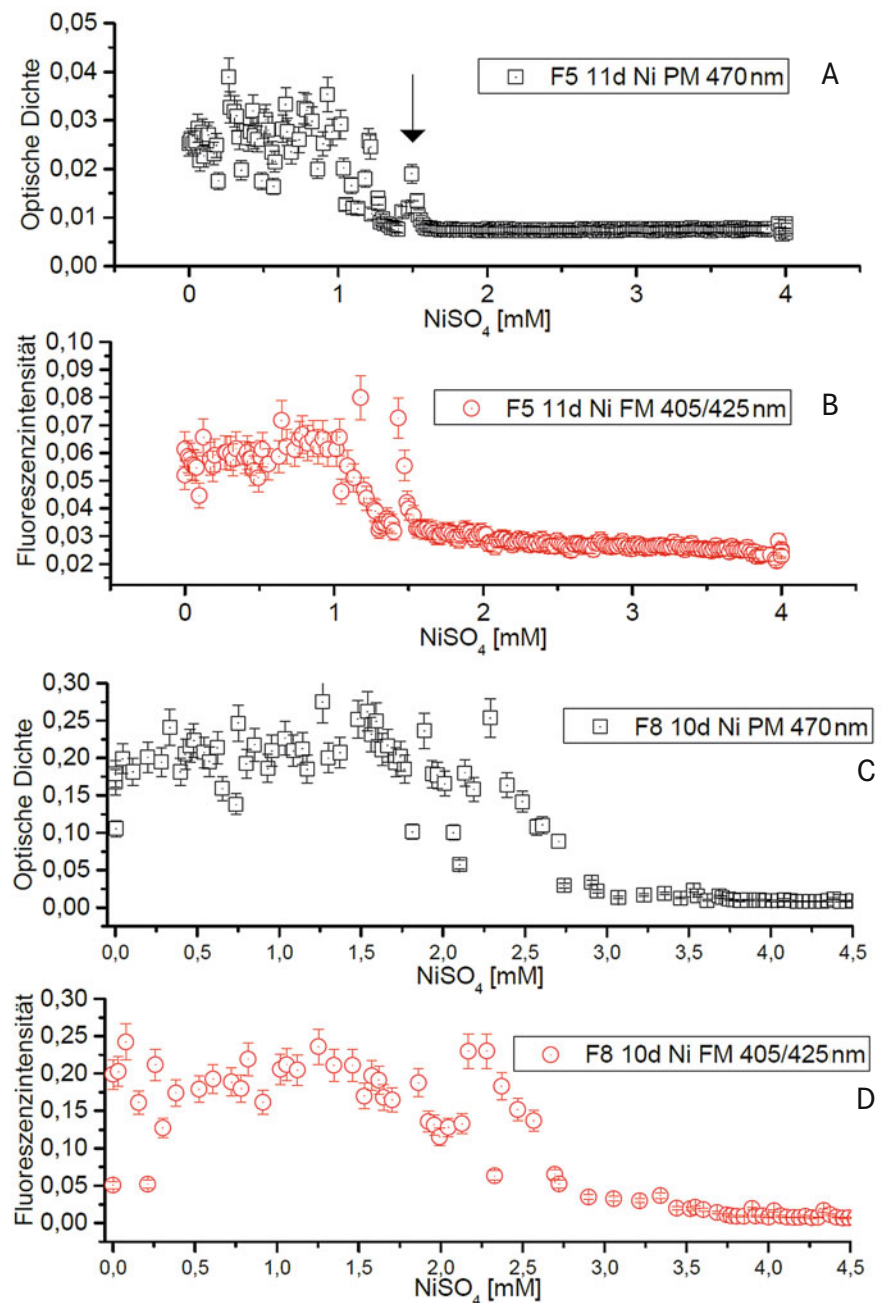
► **Abb. 1:** Vorgehensweise bei der Anwendung der Mikrofluidsegmenttechnik zur Untersuchung von Bodenmikroorganismen. Von Altbergbauarealen gewonnene Bodenproben mit Mikroorganismen werden suspendiert und diese Suspension von groben Partikeln abgetrennt. Aus der Suspension wird eine Serie von Mikrofluidsegmenten erzeugt, wobei durch Mischung von effektorfreiem und effektorhaltigem Medium eine fein abgestufte Konzentrationsreihe entsteht. Diese Serie von kleinsten Kulturvolumina wird einige Tage bis Wochen inkubiert und anschließend mit Mikrodurchflussfluorimetrie und -Photometrie die konzentrationsabhängige Antwort der Gemeinschaft auf den Effektor gemessen. Anschließend werden Einzelkulturen aus einzelnen Tropfen oder Tropfengruppen, also unterschiedlichen Konzentrationsbereichen isoliert, genetisch typisiert und die Dosis-Wirkungs-Funktionen der Einzelkulturen bestimmt.



Die Mikroorganismen des Bodens stellen eine Grundlage unserer Ökosysteme dar [1]. Die Lebensgemeinschaften der Bakterien und Pilze im Boden sind physiologisch eng mit den Pflanzen und Tieren verbunden, stark von den lokalen Bedingungen abhängig und hoch divers [2]. Sie beeinflussen den lokalen Wasserhaushalt und sorgen für die Verfügbarkeit von Nährstoffen, biologisches Recycling und Robustheit gegenüber dem Wechsel äußerer Bedingungen und Störungen. Metagenomstudien der vergangenen Jahre zeigten, dass die Mikrobiome von Pflanzen und Tieren sich ständig mit den Bodenmikrobiomen austauschen. Auf diesem Wege kann auch ein intensiver Gentransfer stattfinden [3]. Die Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft unterscheidet sich von Standort zu Standort [4], und auch innerhalb eines Standortes kommen meist viele verschiedene Organismen vor [5]. Schätzungen gehen davon aus, dass bisher nur rund ein Prozent der Arten identifiziert wurde und selbst bekannte Arten in zahlreiche Unterarten und Stämme mit unterschiedlichen Stoffwechselmerkmalen und ökologischen Funktionen zerfallen [6]. Das lässt ein großes Potenzial von Syntheseleistungen – z. B. von unbekannt biologischen Wirkstoffen – erwarten, das bisher noch nicht biotechnisch genutzt wird.

Genetische Informationsflut – ökologische Informationslücke

Inzwischen liegen eine Vielzahl von Genomsequenzen von zahlreichen Mikroorganismen und Metagenomdaten von sehr unterschiedlichen Standorten vor. Von zahlreichen Bakterien gibt es zudem 16S-rRNA-Daten, die eine taxonomische Einordnung unterstützen. Diesen wertvollen genetischen Informationen steht eine empfindliche Wissenslücke beim Verständnis der ökologischen Zusammenhänge gegenüber [7]. Das betrifft zum einen die Wechselbeziehungen der Organismen untereinander und zum anderen deren Verhalten gegenüber chemischen Einflussfaktoren, wie biogenen Schadstoffen und toxischen anorganischen Bodenbestandteilen. Wegen der enormen Vielzahl von Wirkungen und Wechselbeziehungen sind diese Informationen über konventionelle Verfahren oft nur fragmentarisch vorhanden und mühsam zu beschaffen. Deshalb werden neue Verfahren benötigt, die detaillierte Informationen zu den Wechselbeziehungen der Organismen und Dosis-Wirkungs-Zusammenhängen liefern.

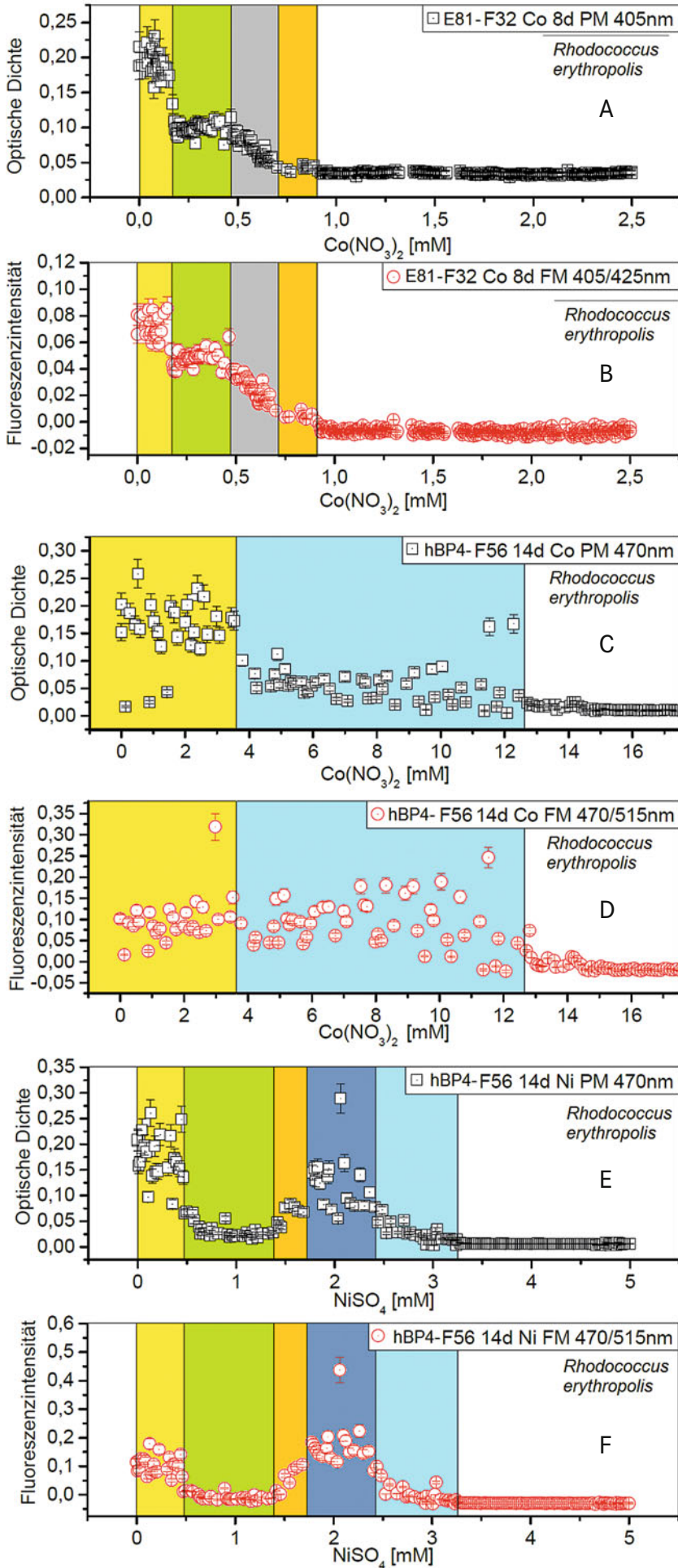


▲ **Abb. 2:** Mikrofluidisch ermittelte hochaufgelöste Dosis-Wirkungs-Zusammenhänge von zwei Isolatn gegenüber Nickelionen aus einem historischen Kupferbergbaugebiet (Hettstedt, Kupferberg). Charakterisierung anhand der optischen Transmission bei 470 nm (schwarz: A, C) und der Autofluoreszenz bei einer 405-nm-Anregung (rot: B, D) nach elf bzw. zehn Tagen Inkubation. **A, B,** Stamm der Gattung *Streptomyces*; **C, D,** *Rhodococcus erythropolis* (weitere Details siehe Text).

Hochaufgelöste Dosis-Wirkungs-Funktionen per Mikrofluidsegment-technik

Die Einführung miniaturisierter Verfahren erlaubt es, ökologische und toxikologische Daten effektiver zu ermitteln. Tropfenbasierte Methoden werden vor allem eingesetzt, um die Wirkung von Antibiotika zu erfassen [8, 9], finden aber auch für die Ermittlung der Wirkung von Nanopartikeln und Schwermetallionen [10] sowie für das Screening nach speziellen Syntheseleistungen Anwen-

dung [11]. Für Schwermetall-belastete Böden in Industriegebieten und Bergbauarealen ist die Beurteilung der Schwermetalltoleranz einzelner Stämme und Lebensgemeinschaften von zentraler ökologischer Bedeutung. Zudem haben schwermetalltolerante Mikroorganismen spezielle Transport- und Speichermechanismen als Schutzstrategien entwickelt, die vielleicht in Zukunft in neuen biotechnischen Verfahren – etwa im Metallrecycling – angewendet werden könnten [12].



In den vergangenen Jahren wurde die Mikrofluidsegmenttechnik für die Anwendung auf schwermetalltolerante Bodenmikroorganismen eingesetzt und weiterentwickelt. Bei dieser Technik erzeugen mikrofluidische Tropfengeneratoren, die sich sehr präzise in Chiptechnologie herstellen lassen, Serien von Tropfen mit Einzelvolumina im Submikroliter- oder Nanoliterbereich [13]. Jeder Tropfen kann eine andere Konzentration eines zu testenden Effektors enthalten. So können durch kleine Konzentrationsabstufungen fein aufgelöste Konzentrationsprogramme realisiert werden. Das Verfahren ist dabei sehr materialsparend. So können aus einem Milliliter rund 2.000 Submikrolitertropfen erzeugt werden. Für eine Ein-Prozent-Abstufung mit Tropfen im unteren Nanoliterbereich genügt eine Gesamtmenge von weniger als einem Mikroliter. Diese Tropfen können für eine Inkubation unter Erhaltung ihrer Anordnung und damit auch der jeweiligen Konzentrationsinformation über Wochen gespeichert werden. Das konzentrationsabhängige Wachstum wird anhand der Änderung der optischen Dichte oder der Autofluoreszenz bewertet. Mehrkanal-Mikrodurchflusssensoren erlauben eine rasche Beurteilung der Bildung von Chromophoren [14]. Durch diese Verfahren wurde beispielsweise eine Stimulation der Fluorophorenbildung durch Schwermetalle im subletalen Bereich *in situ* nachgewiesen. Die Vorgehensweise beim Einsatz der Mikrofluidsegmenttechnik zur Untersuchung von Bodenmikroorganismen zeigt **Abbildung 1**. Durch die Verteilung des Bodenmaterials auf eine Vielzahl von Tropfen (Mikrofluidsegmente) entsteht eine repräsentative Serie von separaten Volumina, die jeweils eine zufällige Auswahl von Organismen – eine stochastisch reduzierte Gemeinschaft – enthält. Aus der Gesamtheit dieser Fluidkompartimente ergibt sich ein Antwortbild, z. B. gegenüber abgestuften Konzentrationen von Schwermetallionen. Durch eine

◀ **Abb. 3:** Mikrofluidisch ermittelte hochaufgelöste Dosis-Wirkungs-Zusammenhänge von zwei Isolaten der gleichen Spezies (*Rhodococcus erythropolis*) von zwei verschiedenen Standorten: **A, B**, Kupfermetallurgie-Altindustriestandort, Eisleben-Oberhütte, **C–F**, archäologisch geborgenes Bodenmaterial aus einer Metallgegenstände enthaltenden mittelalterlichen Siedlungsgrube, Altenburg (Thüringen). Charakterisierung anhand der gleichzeitigen Messung der Dämpfung der Transmission (**A, C, E**) und der Autofluoreszenz bei einer 470-nm-Anregung (**B, D, F**).

mikrofluidische Folgekultivierung oder eine Übertragung einzelner Tropfen oder Tropfengruppen in Mikrotiterplatten und Agarplatten können je nach angewendetem Effektor und ausgewähltem Konzentrationsbereich unterschiedliche schwermetalltolerante Mikroorganismen isoliert werden.

Im Gegensatz zu Dosis-Wirkungs-Funktionen mit stärkerer Streuung oder allmählichen Übergängen, wie sie bei der Untersuchung der Mikroorganismengemeinschaften häufig beobachtet werden, sind die entsprechenden Antwortfunktionen der Isolate in der Regel durch charakteristische Verläufe mit schärferen Übergängen gekennzeichnet. **Abbildung 2** zeigt zwei Beispiele von moderat nickeltoleranten Stämmen, die aus Bodenproben eines Altbergbaugebietes isoliert wurden und für die anhand der fein abgestuften Nickelkonzentrationen kritische Werte von etwa 1,2 bzw. 2,5 mM ermittelt wurden. Stämme der gleichen Art, die von verschiedenen Standorten stammen, weisen oft deutliche Unterschiede in den hochaufgelösten Antwortkurven auf, was auf unterschiedliche Schwermetalltoleranzen und unterschiedliche metabolische Fähigkeit hinweist. So zeigt ein *Rhodococcus erythropolis*-Stamm aus einer Bodenprobe von Eisleben-Oberhütte eine Dämpfung des Wachstums bereits bei 0,2 mM Kobalt (Co) und eine vollständige Unterdrückung des Wachstums bei etwa 0,9 mM Kobalt (**Abb. 3A, B**). Demgegenüber wächst ein aus einer Schwermetall-belasteten archaischen Bodenprobe von Altenburg isolierter *Rhodococcus erythropolis*-Stamm bei bis zu 15 mM Kobalt (**Abb. 3C, D**). Das gleiche Isolat weist auch eine besonders charakteristische Dosis-Wirkungs-Funktion gegenüber Nickelionen auf (**Abb. 3E, F**). So folgt einem reduzierten Wachstum im Konzentrationsbereich zwischen 0,25 und 1,5 mM ein deutliches Wachstum zwischen 1,7 und 2,4 mM, was auf die Stimulation spezieller Stoffwechselaktivitäten durch die Nickelionen in diesem Bereich hindeutet.

Miniaturisierung – neue Perspektiven für Toxikologie und Ökologie

Die vorgestellten Beispiele zeigen, wie die Mikrofluidsegmenttechnik zur Untersuchung von Bodenmikroorganismen, zur Isolation neuer Stämme mit speziellen Toleranzmerkmalen und zur Bewertung des Verhaltens von Mikroorganismengemeinschaften des Bodens gegenüber toxischen Komponenten insgesamt beitragen kann. Sie stellt eine leistungsfähige Strategie dar, um hochaufgelöste Dosis-

Wirkungs-Funktionen zu ermitteln und in großem Umfang Daten zur Reaktion von Mikroorganismen auf ein breites Spektrum von Schadstoffen und anderen Umweltkomponenten zu gewinnen. Die mikrofluidische Technik ist dabei nicht nur für die Beurteilung einer bestimmten Bodensituation interessant. Sie birgt zugleich ein großes Potenzial zur Aufklärung ökologischer Zusammenhänge sowie für die Isolierung, Charakterisierung und Nutzung neuer Stämme von Bodenmikroorganismen mit speziellen Toleranzmerkmalen und metabolischen Aktivitäten, die in Zukunft biotechnologisch nutzbar gemacht werden können.

Danksagung

Für eine fruchtbare Kooperation danken wir E. Kothe, B. Funai, M. Roth, K. Martin, T. Henkel, M. Kielpinski (Jena), S. Löbbecke, A. Mendl (Pfinzthal), G. Gastrock, S. Wiedemeier, B. Cahill, K. Lemke (Heiligenstadt) sowie A. Groß, S. Schneider, F. Möller, K. Bergmann, M. Günther, K. Wetzels und D. Brauer (Ilmenau). Ganz besonders danken die Autoren F. Ganß (Ilmenau) für die Isolierung der Stämme und die DNA-Abtrennung für die Typisierung. Für finanzielle Unterstützung unserer Forschung im Rahmen des Verbundprojektes BactoCat (Förderkennzeichen: 031A161A) danken wir dem BMBF.

Literatur

- [1] Torsvik V, Sorheim R, Goksoyr J (1996) Total bacterial diversity in soil and sediment communities – a review. *J Ind Microbiol* 17:170–178
- [2] Fierer N, Jackson RB (2006) The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:626–631

- [3] Kristiansson E, Fick J, Janzon A et al. (2011) Pyrosequencing of antibiotic-contaminated river sediments reveals high levels of resistance and gene transfer. *Plos One* 6:e17038
- [4] Giller KE, Beare MH, Lavelle P et al. (1997) Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. *Appl Soil Ecol* 6:3–16
- [5] Prashar P, Kapoor N, Sachdeva S (2014) Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. *Rev Environ Sci Biotechnol* 13:63–77
- [6] Riesenfeld CS, Schloss PD, Handelsman J (2004) Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annu Rev Genet* 38:525–552
- [7] Torsvik V, Ovreas L (2002) Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr Opin Microbiol* 5:240–245
- [8] Churski K, Kaminski TS, Jakiela S et al. (2012) Rapid screening of antibiotic toxicity in an automated microdroplet system. *Lab Chip* 12:1629–1637
- [9] Cao J, Kürsten D, Schneider S et al. (2012) Uncovering toxicological complexity by multi-dimensional screenings in microsegmented flow: modulation of antibiotic interference by nanoparticles. *Lab Chip* 12:474–484
- [10] Cao J, Köhler JM (2015) Droplet-based microfluidics for microtoxicological studies. *Eng Life Sci* 15:306–317
- [11] Najah M, Valbrix R, Mahendra-Wijaya IP et al. (2014) Droplet-based microfluidics platform for ultra-high-throughput bioprospecting of cellulolytic microorganisms. *Chem Biol* 21:1722–1732
- [12] Garcia-Garcia JD, Sanchez-Thomas R, Moreno-Sanchez R (2016) Bio-recovery of non-essential heavy metals by intracellular and extracellular mechanisms in free-living microorganisms. *Biotechnol Adv* 34:859–873
- [13] Grodzian A, Metz J, Henkel T et al. (2004) Segmented flow generation by chip reactors for highly parallelized cell cultivation. *Biosens Bioelectron* 19:1421–1428
- [14] Kürsten D, Kothe E, Wetzels K et al. (2014) Micro-segmented flow and multisensor-technology for microbial activity profiling. *Environ Sci Process Impacts* 16:2362–2370

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Michael Köhler
Institut für Mikro- und Nanotechnologien
Institut für Chemie und Biotechnik
Technische Universität Ilmenau
PF 10 05 65
D-98684 Ilmenau
Tel.: 03677-69-3629
Fax: 03677-69-3179
michael.koehler@tu-ilmenau.de

AUTOREN



Jialan Cao

Jahrgang 1979. Elektrotechnikstudium mit Fachrichtung Biomedizintechnik an der TU Ilmenau; dort 2010–2014 Promotion am Institut für Chemie und Biotechnik. Seit 2015 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Fachgebiet Physikalische Chemie/Mikroreaktionstechnik.



Tim Schüller

Jahrgang 1965. Studium der Physik, Ur- und Frühgeschichte und Klassischen Archäologie an der Universität Jena. 1995 Promotion zum Dr. rer. nat. Seit 1994 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Thüringischen Landesamt für Denkmalpflege und Archäologie, derzeit Abteilungsleiter Archäologische Fachaufgaben, Sachgebietsleiter Prospektion und Fachreferent Altsteinzeit sowie kommissarischer Leiter der Restaurierungswerkstatt.



J. Michael Köhler

Jahrgang 1956. 1976–1981 Chemiestudium an den Universitäten Halle und Jena. Ab 1982 am Physikalisch-Technischen Institut der Akademie der Wissenschaften. Seit 1992 Abteilungsleiter am Institut für Physikalische Hochtechnologie in Jena. Seit 2001 Leiter des Fachgebiets Physikalische Chemie/Mikroreaktionstechnik an der TU Ilmenau.